

Experimentelle Untersuchung an einem durch  
Endotoxin und Exotoxin induzierten Modell der septischen Lunge:  
NO als Regulator der Vasomotorik

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schlaudraff, Jan Matthias  
aus Lich

Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universitätskliniken Gießen und Marburg  
Medizinische Klinik II, Gießen

Leiter:  
Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: PD Dr. L. Ermert

Tag der Disputation: 11.09.2006



# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1.	Vorwort	1
1.2.	Physiologische Bedeutung von NO	1
1.2.1	Synthese und Metabolismus	4
1.3.	ARDS und Sepsis	6
1.3.1	Sepsis	9
1.4.	E.coli-Hämolyisin und Lipopolysaccharid (LPS)	12
1.4.1	Lipopolysaccharid LPS	12
1.4.2	E.coli Hämolyisin (HlyA)	15
1.5.	Fragestellung	16

## 2. Grundlagen und Messprinzipien

2.1.	Physikalische und chemische Eigenschaften von NO	17
2.2.	Prinzipien der NO-Messung (Chemilumineszenz)	20
2.2.1	Chemilumineszenz	20
2.2.2	Messprinzip zur Erfassung oxidativer Endprodukte des NO	21

## 3. Material und Methoden

3.1.	Material und Geräte für das Modell der isolierten Lunge	24
3.1.1	AETU	24
3.1.2	Gase, Chemikalien und Pharmaka	26
3.2.	Material und Geräte für die Chemilumineszenzmessung	28

3.2.1	Materialien	28
3.2.2	Geräte	28
3.3.	Modell der isolierten Lunge	29
3.3.1	Einführung	29
3.3.2	Versuchsaufbau	30
3.3.3	Präparation der Kaninchenlunge	33
3.3.4	Aufwärmphase und Kalibrierung der Messeinrichtung	35
3.4	Bestimmung der Aktivität des Escherichia coli Hämolytins (Hly)	36
3.5.	Integration der Messanalytik in das Modell der isolierten Lunge	37
3.5.1	Einbau des Chemilumineszenzdetektors für die Atemanalyse	37
3.5.2	Einbau der Analytik für die NO <sub>x</sub> -Messung aus dem Perfusat	37
3.6.	Ausgangsbedingungen	38
3.7.	Versuchsgruppen	39
3.7.1	LPS-„Priming“ und Exotoxin-Stimulation (HlyA)	39
3.7.2	Einfluß einer Langzeit-Hemmung der iNOS	40
3.7.3	Einfluß einer kurzzeitigen iNOS-Hemmung	41
3.8.	Statistische Analyse	41

## 4. Ergebnisse

4.1.	LPS-Priming	42
4.2.	Stimulation mit E.coli-Hämolytinsin	43
4.2.1	Stimulation mit E. coli-Hämolytinsin ohne Priming	43
4.2.2	Stimulation mit E. coli-Hämolytinsin bei LPS-Priming	43
4.2.3	Tx-Rezeptor Blockade	44
4.3.	Einfluß von Dexamethason	45
4.4.	Langzeit- und Kurzzeithemmung der iNOS mit AETU	46
4.5.	Einfluß von Serum (Kaninchenserum 1%)	47

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1.	Mechanismen der Vasodilatation und Vasokonstriktion beim ARDS	63
5.2.	Signaltransduktion	66
5.3.	Pathophysiologische Veränderungen beim ARDS	67
5.4.	Selektive Hemmung der iNOS - eine neue Strategie?	68
5.5.	Therapieansätze am Mensch	70
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	72
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen und Symbole</b>	75
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	77
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	94



# 1. Einleitung

## 1.1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand im Laborbereich der klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Seeger. Die Untersuchung behandelt die Messung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) an einem Modell des septischen Lungenversagens.

Vor dem klinischen Hintergrund des ARDS und der bisher nur unvollständig verstandenen komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge eines septischen Organversagens, wurden die Mechanismen der Stickstoffmonoxidbildung, und damit der Gefäßregulation, an einem Modell des septischen Lungenversagens untersucht.

Die Arbeit beschreibt und diskutiert Ergebnisse der Anwendung von speziellen Hemmstoffen der Stickstoffmonoxidsynthasen. Sie gibt Hinweise zum Ablauf der pathophysiologischen Vorgänge am Lungengefäßbett, um zukünftig eine gezieltere Behandlung des septischen Lungenversagens zu ermöglichen.

## 1.2. Physiologische Bedeutung von NO

In der praktischen Medizin wurden Nitrate als Stickstoffmonoxid (NO)-liberierende Medikamente schon lange zur erfolgreichen Behandlung von Erkrankungen wie arteriellem Hypertonus und koronarer Herzerkrankung eingesetzt, ohne dass der genaue Wirkmechanismus bekannt war.

Auch in der medizinischen Forschung spielte NO lange Zeit keine Rolle. Es galt als Noxe aus Verbrennungsvorgängen mit gewisser toxischer Bedeutung als Methämoglobinbildner.

Die Identifizierung von Stickstoffmonoxid als den bis dahin so genannten (FURCHGOTT und ZAWADSKI, 1980) körpereigenen Stoff EDRF (endothelium derived relaxing factor), gelang erst 1987 den Arbeitsgruppen um IGNARRO und PALMER. 1988 wiesen PALMER et al. und SAKUMA et al. das dazugehörige Enzymsystem im menschlichen Körper nach, das aus der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin mittels des Enzyms NO-Synthase gasförmiges NO freisetzt.

Seither konnten drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase in Endothelzellen der Gefäße, in Blutzellen, in Zellen des zentralen Nervensystems, in Epithelzellen und in glatten

Muskelzellen nachgewiesen werden (Tab 1.1) (MONCADA et al., 1993, DAVIES et al., 1995, GASTON et al., 1994).

Die NO-Synthasen endothelialen und neuronalen Ursprungs (eNOS/cNOS bzw. nNOS) sind permanent vorhanden und werden als konstitutive Synthasen bezeichnet. Unter physiologischen Bedingungen regulieren diese durch Vasodilatation Blutfluß und Blutdruck (MONCADA et al., 1991). Die Exprimierung der dritten, induzierbaren Synthase (iNOS), erfolgt erst nach Induktion durch bakterielle Toxine und Zytokine wie Lipopolysaccharide (LPS), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-2) (LIU et al., 1993, GRIFFITHS et al., 1995, YOSHIZUMI et al., 1993, THIEMERMANN et al., 1993, NATHAN et al., 1992, NATHAN et al., 1997).

Tabelle 1.1 Charakterisierung der NOS-Isoformen

	Typ I	TypII	Typ III
Bezeichnung *	nNOS	iNOS	eNOS/cNOS
Expression	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
intrazell. Lokalisation	cytosolisch	cytosolisch	membranständig
Zelltypen	Neuronen Skelettmuskulatur	gl.Gefäßmuskulatur Endothelien, Endokard Monozyten/Makrophg. neutrph. Granulozyt.	Endothelien, Endo-u. Myokard Thrombozyten
Auslöser	Glutamat	LPS, TNF- $\alpha$ INF- $\gamma$ , IL-2, IL- $\beta$	ACh, ADP, Druck Histamin, shear stress
Calciumaktivierung	+	-	+
NO-Freisetzung	gering	hoch (1:1000)	gering

\*nNOS= neuronale NOS, iNOS= induzierbare NOS, e/cNOS= endotheliale/konstitutive NOS

Je nach Bildungsort und Bildungsmodus konnten so dem NO nach und nach eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Funktionen zugeschrieben werden

(FORSTERMANN et al., 1994), so dass man von einem nahezu ubiquitären biologischem Botenstoff sprechen kann (KIRKEBOEN et al., 1999).

So weiß man heute, dass NO eine entscheidende Rolle bei der Gefäßregulation (MONCADA et al., 1991), sowie als Neurotransmitter (GARTHWAITE et al., 1988) spielt. Des Weiteren werden dem NO Einflüsse auf die Plättchenaggregation und -adhäsion (RADOMSKI et al., 1987, AZUMA et al., 1986) und die Funktion als immunregulatorisches Agens (MONCADA et al., 1993, SZABO et al., 1994, O'DONNELL et al., 1994) zugeschrieben.

Die physiologische Regulation des Gefäßtonus der Lunge durch die NO-Produktion der konstitutiven, endothelialen NOS gilt als gesichert (STAMLER et al., 1994).

Weitere Beispiele für die physiologische und pathophysiologische Beteiligung von NO sind die Regulation des Gefäßtonus der Koronarien, Regulation von Peristaltik und Tonus des Gastrointestinaltraktes, unspezifische Immunabwehr durch Makrophagen und Regulation der Durchblutung des Corpus cavernosum (MONCADA et al., 1991, BURNETT et al., 1995).

### 1.2.1 Synthese und Metabolismus

Stickstoffmonoxid entsteht in Anwesenheit von Sauerstoff bei der Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin aus dem endständigen Stickstoff der Guanidinogruppe (PALMER et al., 1988). Diese Reaktion wird, abhängig vom Bildungsort, von verschiedenen Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS), einem komplexen Hämoprotein, katalysiert.

Als Kofaktoren werden zusätzlich Flavinmononucleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), als Derivate des Riboflavins (Vit. B<sub>2</sub>), sowie Tetrahydrobiopterin (THB) benötigt (DAVIES et al., 1995).

Die konstitutive NO-Synthase ist Ca<sup>2+</sup> und Calmodulin-abhängig. Die NO-Freisetzung erfolgt nach rezeptorgekoppelter Aktivierung durch Acetylcholin, Bradykinin und Glutamat für die neuronale NOS oder als Antwort auf einen physikalischen Stimulus (shear-stress). Die NO-Freisetzung erfolgt schnell, kontinuierlich-pulsatil und in kleinen Mengen.

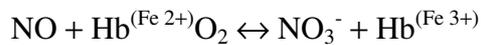
Das NO diffundiert dann zur Zielzelle, beispielsweise von der Endothelzelle zur benachbarten glatten Muskelzelle. Dort reagiert es mit dem Eisen der Hämgruppe der löslichen Guanylatcyclase. Die Guanylatcyclase produziert cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Der intrazelluläre Anstieg von cGMP führt über die Aktivierung von Proteinkinase G zu einer Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle (LINCOLN et al., 1993, HART et al., 1999).

Die iNOS wird dagegen im Endothel nach Kontakt mit bakteriellem Lipopolysaccharid im Rahmen eines Entzündungsgeschehens oder nach Kontakt mit Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder IL-2, IL- $\beta$  exprimiert (LAMAS et al., 1991, HIBBS et al., 1992, LIU et al., 1993, NATHAN et al., 1994). Dies führt zu einer anhaltenden und 1000-fach höheren NO-Freisetzung mit Gefäßdilatation und Hypotonie, wie es während des septischen Schocks zu beobachten ist (SINGH et al., 1997).

Des Weiteren entfaltet das NO eine zytotoxische Wirkung in der Zelle durch die Reaktion mit Sauerstoffsuperoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) zu Peroxynitrit (OONO<sup>-</sup>). Aus diesem geht das oxidative Schäden hervorrufende Hydroxylradikal (OH•) hervor (BECKMAN et al., 1990, PRYOR et al., 1995, KOOY et al., 1995).

Im übrigen Organismus und beim Anfall kleinerer Mengen wird NO, mit Ausnahme der Lunge, wo es auch unmittelbar abgeatmet werden kann, zum stabilen Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) bzw. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oxidiert und renal ausgeschieden (SINGH et al., 1997).

Im Blut diffundiert NO in die Erythrozyten und reagiert mit oxigeniertem Hämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin:



Dies stellt ebenfalls eine Inaktivierung dar und verhindert systemische zirkulatorische Effekte (FROSTELL et al., 1993).

Im Plasma bindet NO über die Bildung von Nitrosothiolen an Serumproteine wie z. B. Albumin (SIMON et al., 1996).

### 1.3. ARDS und Sepsis

Der Begriff des ARDS (acute (adult) respiratory distress syndrome) ist erstmals von ASHBAUGH und PETTY 1967 verwendet worden. Er beschreibt ein mit schwerer Lungenschädigung einhergehendes Syndrom mit den Symptomen Zyanose, Dys- und Tachypnoe ohne Besserung durch Sauerstoffzufuhr, Ödembildung, herabgesetzte Compliance und diffuse bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax-Bild. Seit den letzten Konsensuskonferenzen definieren folgende Kriterien ein ARDS (BERNARD et al., 1994, ABRAHAM et al., 2000):

- I. Akutes Auftreten der Erkrankung
- II. Verhältnis arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) / inspiratorische Sauerstoffkonzentration (fraction of inspired oxygen;  $\text{FiO}_2$ )  $\leq 200$  mm Hg, unabhängig vom verwendeten positiven endexpiratorischen Druck (positive endexpiratory pressure; PEEP)
- III. bilaterale Infiltrate auf dem Röntgenbild
- IV. pulmonalkapillärer Verschlussdruck (pulmonary capillary wedge pressure; PCWP)  $\leq 18$  mm Hg oder keine anderen Zeichen einer linksatrialen Hypertension, wenn der PCWP nicht bestimmt wurde.

Viele Untersuchungen haben zum besseren Verständnis dieser klinisch-pathologischen Entität beigetragen. Der therapeutische Fortschritt ist jedoch weiterhin gering, und die Mortalität beträgt weiterhin bis zu 60 % für das Vollbild eines ARDS (LEVANDOWSKI et al., 1996).

Ein ARDS kann durch direkte Schädigung des Lungengewebes (Aspiration, Surfactantmangel, Pneumonie, Kontusion, Inhalationstrauma) entstehen, aber auch sehr oft sekundäre Ursachen (Schock, Fettembolie, Sepsis, Polytrauma, Hämolyse, Pankreatitis, Massentransfusion, Fruchtwasserembolie, anaphylaktische Reaktion, zentrales Lungenödem) haben (PARSONS et al., 1989, DONNELLY et al., 1994, PITTET et al., 1997, CONNELLY et al., 1997).

Die komplexe Pathophysiologie des ARDS ist gekennzeichnet durch eine diffuse Schädigung des pulmonalen Kapillarnetzes, die zu einer gesteigerten Permeabilität und zur Ausbildung eines nicht kardial bedingten, interstitiellen und intraalveolären Lungenödems führt (LECHIN et al., 1994). Am Ende steht eine fibrosierende und proliferative Entzündung mit Zerstörung der Alveolarstruktur.

Des Weiteren zeigt sich eine arterielle Hypoxämie, hervorgerufen durch einen großen intrapulmonalen Rechts-Links-Shunt ( $Q_s/Q_t$ ), sowie ein erhöhter pulmonalarterieller Druck (PAP). Die Lungencompliance ist stark vermindert.

Im Anfangsstadium zeigt sich in der arteriellen Blutgasanalyse ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck ( $PaO_2$ ) und Kohlendioxidpartialdruck ( $PaCO_2$ ) als Ausdruck der Hypoxämie und hyperventilationsbedingten Hypokapnie. Mit Fortschreiten der Erkrankung nimmt die Hypoxie zu, und es entsteht schließlich eine ausgeprägte Hyperkapnie. Eine Erhöhung der  $FiO_2$  auf 1, also eine Beatmung mit 100% Sauerstoff, führt nicht zu einer Erhöhung des  $PaO_2$ .

In der Therapie des ARDS-Patienten galt lange Zeit die maschinelle Beatmung mit hohem PEEP (positive endexpiratory pressure)-Niveau bis 25 cm  $H_2O$ , großem Atemzugsvolumen (10-15ml/kg KG) und hoher inspiratorischer Sauerstoffkonzentration als Standard.

Heute weiß man, dass diese Beatmungsform der ARDS-Lunge mehr Schaden als Nutzen zufügt.

Seit den Arbeiten von DREYFUSS 1988, LODATO 1990 und AMATO 1998 weiß man, dass es ein hohes  $FiO_2$  ( $\geq 0,5$ ), große Atemzugvolumina und hohe Atemwegsspitzen drücke (peak inspiratory pressure; PIP) zu vermeiden gilt.

Nach neueren Erkenntnissen hat die Beatmungstherapie des ARDS nicht mehr die Wiederherstellung der Normalwerte für  $PaO_2$ ,  $PaCO_2$  und des arteriellen pH-Wert zum Ziel. Eine erfolgreiche Behandlung des ARDS ist nur mit einem therapeutischen Gesamtkonzept, das neben der Behandlung der Grunderkrankung eine druckkontrollierte Beatmung mit „optimierten“ PEEP (STEWART et al., 1998), eine permissive Hyperkapnie (TUXEN et al., 1994), intermittierende Bauchlagerung des Patienten (BLAIR et al., 1995, PELOSI et al., 1998) sowie ggf. extrakorporale Gasaustauschverfahren beinhaltet (LEVANDOWSKI et al., 1996).

Weiterhin hat sich die inhalative NO-Applikation, zumindest beim nichtseptischen ARDS-Patienten, zu einem Stützpfiler der Therapie entwickelt. ROSSAINT et al., 1993 und BIGATELLO et al., 1994, konnten durch eine Inhalation mit NO eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung und Verringerung des mittleren PAP erzielen.

Klinische Studien zur inhalativen NO-Applikation zeigten bei 60 % der Patienten eine Verbesserung der Oxygenierung , allerdings bei unveränderter Mortalität (DELLINGER et al., 1998, 2004).

### 1.3.1 Sepsis

Der Begriff der Sepsis beschreibt eine Allgemeininfektion mit schweren dysfunktionellen Krankheitserscheinungen wie Hypoperfusion und Hypotension, Fieber, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose (ABRAHAM et al., 2000), die infolge konstanter oder periodischer Aussaat von Mikroorganismen oder deren Pathogenitätsfaktoren von einem Herd aus in die Blutbahn auftreten.

Typische Sepsiserreger sind je nach Alter der Patienten *Escherichia coli* und andere Enterobacteriaceae, Streptokokken, Staphylokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, Salmonellen und *Bacteroides*-Arten. Daneben können aber auch fakultativ pathogene Erreger und sog. gramnegative Problemkeime (*Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, Legionellen und Pilze) im Rahmen einer nosokomialen Infektion eine schwere Sepsis auslösen.

Sepsisherde finden sich unter anderem in folgenden Körperregionen: Gefäße (Thrombophlebitis, Gefäßkatheter, Venenverweilkanülen), Haut (Wundinfektionen), Lunge, Darm, Gallenwege, Urogenitalsystem und HNO-Bereich.

Das klinische Bild ist von hohem, intermittierendem Fieber, Tachykardie, Tachypnoe und deutlicher Verschlechterung des Allgemeinzustandes gekennzeichnet.

Gefürchtete Komplikation einer Bakteriämie ist der septisch-toxische Schock mit einer Mortalitätsrate von im Durchschnitt 49% (FRIEDMAN et al., 1998). Dabei können ca. 30 % dieser Fälle einer Infektion mit grampositiven Erregern zugeschrieben werden (FRIEDMAN et al., 1998).

Bei der Proliferation eines lokalen Infektionsfokus kommt es unter bestimmten Voraussetzungen zur Aussaat der Erreger oder deren Pathogenitätsfaktoren (Toxine). Diese umfassen die aktiv sezernierten, proteinartigen thermolabilen Exotoxine sowie die hochmolekularen, thermostabilen Endotoxine, die Teile der zerfallenen zellulären Substanz des Mikroorganismus darstellen. Beide führen zu einer Aktivierung zellulärer und humoraler Mechanismen im Sinne einer systemischen inflammatorischen Reaktion.

Bei den zellulären Mechanismen stehen als Zielzellen Endothelien, Monozyten/Makrophagen, polymorphonukleäre Granulozyten (PMN), Thrombozyten und

T-Lymphozyten im Vordergrund. Diese reagieren mit einer sekundären Freisetzung einer Vielzahl vasoaktiver und immunmodulierender Mediatoren.

Aus dem komplexen Netzwerk pro- und antiinflammatorisch wirksamer Mediatoren, die je nach Wirkort und Kombination additiv, synergistisch oder antagonistisch wirksam werden können, seien hier folgende beispielhaft genannt:

**Produkte der Cyclooxygenase (COX):** Aus dem Substrat Arachidonsäure entstehen die Prostanoiden wie Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) sowie Thromboxan (TXA<sub>2</sub>). Während Prostazyklin und Prostaglandin E<sub>2</sub> vasodilatativ wirken, stellt Thromboxan A<sub>2</sub> einen bedeutsamen Vasokonstriktor dar. Dies konnte insbesondere auch für das dieser Arbeit zugrunde liegende Organmodell nachgewiesen werden (NEUHOF et al., 1984, SEEGER et al., 1987)

**Produkte der Lipoxxygenasen:** Ebenfalls als Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels entstehen die Leukotriene (LT). Sie sind u. a. Aktivatoren der polymorphonukleären Granulozyten (PMN), sowie an Koronararterien und Bronchien konstriktorisch wirksam (HELLER et al., 1998).

**Plättchen-aktivierender Faktor (PAF):** PAF ist ein proinflammatorischer Mediator mit thrombozytenaggregationsfördernder und leukozytenaktivierender Wirkung (HELLER et al., 1998).

**Zytokine:** Zytokine sind sezernierte Signalsubstanzen der Immunregulation und zellulären Kommunikation. Zu ihnen zählen TNF- $\alpha$ , Interferone (IFN), Interleukine (IL) und Wachstumsfaktoren. Ihre Wirkung erstreckt sich auf die Steuerung der Antikörperproduktion, Aktivierung von T-Lymphozyten, Makrophagen und Killerzellen. Die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und INF- $\gamma$  spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des septischen Schocks. Experimentell konnten durch hohe Dosen von TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  allein Symptome eines septischen Schocks oder eines ARDS ausgelöst werden.

Durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und INF- $\gamma$  konnte eine Induktion der iNOS nachgewiesen werden (LAMAS et al., 1991). Für TNF- $\alpha$  wird zudem eine Hemmung der cNOS beschrieben (YOSHIZUMI et al., 1993). Den antiinflammatorischen IL-4, IL-8, IL-10, IL12 sowie den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  (transforming growth-factor)

und PDGF- $\beta$  (platelet derived growth-factor) wird hingegen ein gegenteiliger Effekt zugeschrieben (McCALL et al., 1992, CUNHA et al., 1992).

**Stickstoffmonoxid:** Durch bakterielle Toxine (z. B. Lipopolysaccharid) direkt, oder durch IL-1 und TNF- $\alpha$ , kommt es zur Transkription der iNOS und damit zu einer zeitverzögerten, aber anhaltenden und massiven NO-Freisetzung (GELLER et al., 1993, LIU et al., 1993). Die mit ihrer zytotoxischen Eigenschaft gegen Mikroorganismen gerichtete NO-Freisetzung verursacht durch ihr hohes Ausmaß Schäden an den Endothelien sowie eine massive Hypotension. Der Schweregrad der septischen Erkrankung korreliert dabei mit den Abbauprodukten des NO (Nox, Nitrate) im Serum (EVANS et al., 1993).

## 1.4. E. coli-Hämolyysin und Lipopolysaccharid(LPS)

### 1.4.1. Lipopolysaccharid (LPS)

In der äußeren Schicht der äußeren Membran gramnegativer Bakterien ist über Lipid A das Lipopolysaccharid (LPS) verankert. LPS, das auch als Endotoxin bezeichnet wird, stellt damit einen integralen Bestandteil der äußeren Zellmembran dar. LPS ist ein extrem potentes Toxin. Eine Aktivierung von Makrophagen erfolgt bereits bei einer Konzentration von 1 pg/ml (FENTON et al., 1998). Das Polymer LPS besteht aus dem Lipid A, dem Kernpolysaccharid (Core), sowie der O-spezifischen Kette (o-chain). Die toxische Wirkung von LPS beruht auf dem Lipid A, die o-Kette ist für die Antigenität entscheidend (GALANOS et al.,1977, GALANOS et al., 1979, RAETZ et al., 1990, RIETSCHHEL et al., 1992).

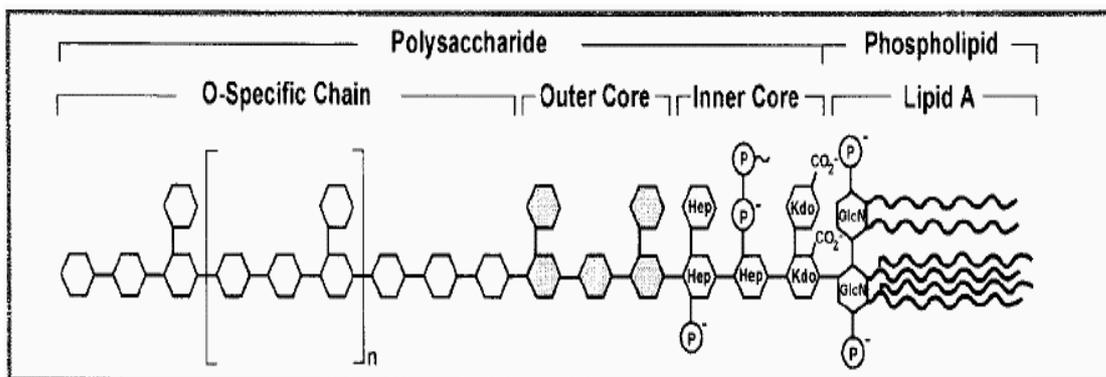


Abb. 1.4. LPS-Polymer

Im Plasma wird LPS an das Lipoprotein-bindende Protein (LBP) gebunden. Hierbei handelt es sich um ein akute-Phase-Protein mit entscheidender Bedeutung bei der Abwehr eines septischen Geschehens (TOBIAS et al., 1986, MATHISON et al., 1992, SCHUMANN et al., 1999). LBP, ein Protein von 65-kDa, liegt im Plasma üblicherweise in Konzentrationen von 2-20 µg/ml vor (GALLAY et al., 1994).

Im Rahmen einer Sepsis oder eines ARDS kommt es zu einem deutlichen Anstieg des LBP mit Plasmakonzentrationen bis 100 µg/ml. Hauptbildungsort ist die Leber, jedoch auch die Lunge. So konnte in der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten ein 64-facher LBP-Gehalt im Vergleich zum Gesunden festgestellt werden (MARTIN et al., 1997).

Die Bindung von LPS an LBP kann einerseits eine Neutralisation bewirken (SKARNES et al., 1966, SKARNES et al., 1968, WURFEL et al., 1994), andererseits führt der Komplex aus LBP und LPS zu einer deutlich beschleunigten Bindung an zelluläre Oberflächenrezeptoren wie CD 14 oder CD 11/18 ( $\beta$ -2 Leukozyten-Integrin) von Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten und steigert so den Aktivierungsgrad dieser Zellen (MATHISON et al., 1992, WRIGHT et al., 1990, HAILMAN et al., 1994). Dieser sensitivierende Effekt wird vereinfachend auch als „Priming“ bezeichnet.

Wie durch die Arbeiten von WRIGHT et al. 1990, KIRKLAND et al. 1993, PUGIN et al. 1993 und HAZIOT et al. 1995 und 1996 gezeigt werden konnte, spielt der Glykoproteinrezeptor CD14 eine entscheidende Rolle im Kontakt der immunkompetenten Zelle mit dem bakteriellen Endotoxin. Jedoch besitzt CD 14 keine membranüberspannende Struktur, um den „Kontakt“ an das Zellinnere zu vermitteln (SCHUTT et al., 1999, FENTON et al., 1998).

Nach neuesten Erkenntnissen erfolgt dies über den Signalweg der so genannten *Toll-like-receptors* (TLR). Der Typ dieses transmembranen Rezeptors wurde erstmals für die *Drosophila*-Fliege beschrieben (HASHIMOTO et al., 1988). Bei diesen Lebewesen, die ohne ein adaptatives Immunsystem auskommen, bewirkt eine Aktivierung der TLR im Rahmen einer Infektion die Genexpression für antimikrobielle Peptide (HOFFMANN et al., 1992, LEMAITRE et al., 1996). Der Nachweis eines homologen Rezeptors beim Menschen gelang 1997 MEDZHITOV und JANEWAY. Bis heute konnten insgesamt zehn verschiedene TLR beim Menschen identifiziert werden (ULEVITCH et al., 2001). Für die Interaktion mit LPS, bzw. einem Komplex aus LBP-LPS/CD14 spielen TLR2 und TLR4 eine zentrale Rolle (KIRSHNING et al., 1998, HOSHINO et al., 1999, UNDERHILL et al., 1999).

Vom zytosolischen Ende des TLR erfolgt die Aktivierung einer Proteinkinaskaskade, die z. B. im menschlichen Monozyten in die Genexpression für verschiedene inflammatorische Mediatoren über Aktivierung der Transskriptionsfaktoren *NF- $\kappa$ B* (*p50/p65*) und *AP-1* (*c-Fos/c-Jun*) ( $\text{I}\kappa\text{B}$  kinase [IKK]-NF- $\kappa$ B pathway, mitogen-activated protein kinase [MAPK]

pathway) mündet (ZHANG et al., 2000, GUHA et al., 2001 , MEANS et al., 2000, ULEVITCH et al., 2001).

### 1.4.2 E. coli-Hämolyisin

Zahlreiche Bakterienspezies sind in der Lage, proteinerge, thermolabile Exotoxine zu synthetisieren. Diese Exotoxine schädigen eukaryote Zellen und stellen damit einen wesentlichen Virulenzfaktor dieser Bakterien dar (CAVALIERI et al., 1984). Zu ihnen gehört auch das *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hämolyisin (HlyA), das bei über 50% bakterieller extraintestinalen Infektionen mit diesem Erreger gefunden wird (WELCH et al., 1981). Seinen Namen verdankt es der zuerst erkannten Eigenschaft, die Zellmembran von Erythrozyten zu zerstören (BHAKDI und TRANUM-Jensen, 1987).

Die proteinerge Struktur dieses Toxins mit einem Molekulargewicht von 107 kD ist bekannt und seine experimentelle Verwendung als pathogener Faktor etabliert (MACMAN et al., 1984, MACMAN et al., 1986; WELCH et al., 1981, WELCH et al., 1984; SEEGER et al., 1988, SEEGER et al., 1991).

Beim Auftreffen auf die Zellmembran von Leukozyten, Erythrozyten und Endothelzellen betten sich die Toxinmonomere in die Lipiddoppelschicht ein. Aus einer Porenbildung (Porendurchmesser 1-2 Nanometer) resultiert eine Membranpermeabilisierung der Zielzelle (BHAKDI et al., 1988, MENESTRINA et al., 1987). Diese transmembranöse Porenbildung zerstört das Milieu der Zelle durch Elektrolytverschiebungen und durch eine intrazelluläre ATP-Verarmung, was schließlich zu Lyse und Zelluntergang führt.

Für das E. coli-Hämolyisin ist in subzytolytischen Konzentrationen aber auch eine Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten über bekannte Mediatorsysteme beschrieben worden. Endothelzellen wie auch PMN beantworten eine Aktivierung durch dieses Exotoxin mit einer deutlichen Freisetzung Arachidonsäure-abhängiger Cyclooxygenase- und Lipoxigenase-produkte wie Leukotriene (LT A<sub>4</sub>), PAF und Prostaglandin I<sub>2</sub> (GRIMMINGER et al., 1990, GRIMMINGER et al., 1991).

An dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Modell der isolierten Kaninchenlunge induziert HlyA bereits in subhämolytischen Konzentrationen einen arteriellen Druckanstieg mit mikrovaskulärer Schrankenstörung und Ausbildung eines massiven Ödems (SEEGER et al., 1989).

## 1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Zusammenspiel“ von bakteriellem Endotoxin und bakteriellem Exotoxin auf die NO-Bildung und damit die Gefäßregulation an einem Modell der isolierten Kaninchenlunge untersucht. Damit wurden Aspekte eines septischen Organversagens simuliert. Die Effekte einer sequenziellen Endo- und Exotoxin-Gabe auf die vasokonstriktorisches-vasodilatatorische Balance der Lungengefäßbahn wurden untersucht. Durch Verwendung eines selektiven iNOS-Inhibitoren und der on-line Messung der exhalativen und intravasalen NO-Freisetzung wurde versucht, den Anteil der NO-Freisetzung durch bakterielles Endotoxin bzw. Exotoxin zu demaskieren.

Vor diesem Hintergrund wurden insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a.) Welchen Einfluss übt Lipopolysaccharid auf die NO-Freisetzung in der isolierten Kaninchenlunge aus?
- b.) Gibt es eine synergistische NO-Bildung nach Vorbehandlung mit LPS und Stimulation mit HlyA ?
- c.) Welchen Einfluß besitzen Glukokortikoide in diesem Zusammenhang auf die NO-Freisetzung?
- d.) Wie beeinflusst ein selektiver iNOS-Inhibitor die LPS-induzierte NO-Freisetzung bzw. die HlyA verursachte NO-Synthese?
- e.) Welche Veränderungen verursacht Endotoxin im pulmonalen Gefäßsystem und ergeben sich daraus Konsequenzen für die Therapie ?

## 2. Grundlagen und Meßprinzipien

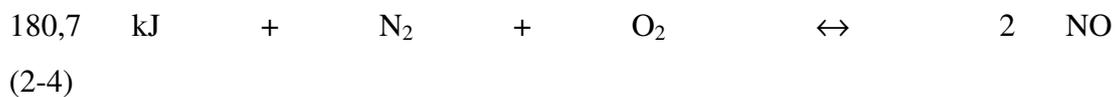
### 2.1. Physikalische und chemische Eigenschaften von NO

Stickstoffmonoxid ist ein farbloses, monomeres, paramagnetisches Gas mit niedrigem Schmelz- und Siedepunkt. Es ist thermodynamisch instabil und zerfällt bei Temperaturen von 1100-1200 °C in die Elemente. Biologisch bedeutsam ist die extreme Lipophilie. Es diffundiert daher leicht, dem Konzentrationsgradienten folgend, durch biologische Membranen.

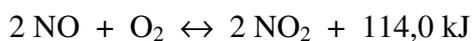
**Tab. 2-2** Einige physikalische Eigenschaften von NO

Schmelzpunkt (°C)	-163,6	Elektr. Dipolmoment ( $10^{-30}$ Cm)	0,53
Siedepunkt (°C)	-151,8	Molare magnet. Suszeptibilität	1461,0
			1,0060
Abstand N-O (pm)	115	(bei 20 °C, 1 atm)	
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O bei 20 °C	4,6	Ionisierungsenergie (kJ mol <sup>-1</sup> )	890,6
(in ml/100 ml) bei 60 °C	2,37	Ionisierungsenergie (eV)	9,23

Die Darstellung von NO in einer chemischen Reaktionsgleichung erfolgt aus molekularem Stickstoff und Sauerstoff in einer stark endothermen Reaktion bei sehr hohen Temperaturen (> 3000 K):



In Luft reagiert NO rasch mit molekularem Sauerstoff zu braunem NO<sub>2</sub> gemäß der Reaktion:



(2-5)

Die Oxidation ist insofern ungewöhnlich, als sie einer Kinetik dritter Ordnung ( $k \cdot [\text{NO}]^2 [\text{O}_2]$ ) gehorcht und einen negativen Temperaturkoeffizienten besitzt, d. h., sie wird mit zunehmender Temperatur langsamer.

In sauerstoffhaltigen, wässrigen Lösungen wird NO nach den folgenden Reaktionssequenzen I. und II. zu seinen stabilen Endprodukten  $\text{NO}_2^-$  (Nitrit) und  $\text{NO}_3^-$  (Nitrat) oxidiert (MARLETTA et al., 1988, GASTON et al., 1994):



(2-6a)



(2-6b)



(2-6c)



(2-6d)



(2-6e)



(2-7a)



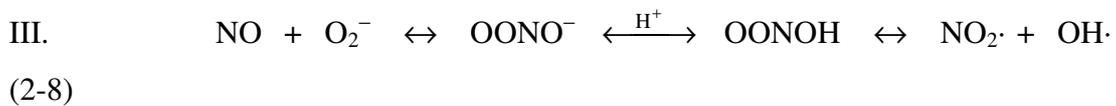
(2-7b)



(2-7c)

Die Halbwertszeit von NO in normoxischer Pufferlösung ist abhängig von der NO-Konzentration und liegt für 0,1 bzw. 1  $\mu\text{M}$  bei 50 bis 500 Sekunden. In Anwesenheit von Sauerstoffsuperoxid ( $\text{O}_2^-$ ) reagiert NO jedoch schnell ( $k \approx 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) zum Peroxynitrit-Anion ( $\text{OONO}^-$ ), welches entweder zu Nitrat isomerisiert oder nach Protonisierung in  $\text{NO}_2 \cdot$  und  $\text{OH} \cdot$  zerfällt, die für die Toxizität von NO mitverantwortlich sind (BLOUGH et al., 1985, SARAN et al., 1990) und in der Lunge

das Bild eines akuten Lungenversagens hervorrufen können (HADDAD et al., 1994, KOOY et al., 1995).



Biologisch von Bedeutung ist ferner die Komplexbildung von NO mit metallhaltigen Proteinen, wie Hämoglobin (Bildung von Methämoglobin) oder Enzymen der mitochondrialen Atmungskette, oder DNA-synthetisierenden Enzymen verschiedener Mikroorganismen (McCLEVERTY et al., 1979; STAMLER et al., 1992). Durch die Bindung der Metallokomplexe wird das allosterische Verhalten der Enzyme, die biologische Verfügbarkeit von NO sowie dessen Oxidationszustand durch Nitrosylierung verändert.

Die Nitrosierung biologisch relevanter nukleophiler Zentren (N, S, C und O) durch  $\text{NO}^+$  führt zur Bildung von Metall-Nitrosyl-Komplexen, Alkyl- und Aryl-Nitriten (RO-NO), Nitrosaminen (RNH-NO) sowie von S-Nitrosothiolen (RS-NO). Diese können als biologisch stabile Transportform des NO angesehen werden, erfüllen jedoch auch selbst physiologische Funktionen wie die Regulation der Gefäßweite und die Aktivierung von Enzymsystemen. Nitrosamine spielen insbesondere im Zusammenhang mit der Cancerogenese eine entscheidende Rolle (WINK et al., 1991, NGUYEN et al., 1992)

## 2.2. Prinzipien der NO-Messung (Chemilumineszenz)

Bei dem dieser Arbeit zugrunde liegendem Versuchsaufbau wurde die kontinuierliche (on-line) Messung des freigesetzten NO realisiert.

Im intravaskulären Kompartiment gelang dies mittels Reduktion der Oxidationsendprodukte des NO (Nitrit, Nitrat und Peroxynitrit; zusammenfassend auch als  $\text{NO}_x$  bezeichnet) durch Vanadium(III)-chlorid und anschließende chemiluminometrische Detektion (SPRIESTERSBACH et al., 1995). Das in das alveoläre Kompartiment freigesetzte NO konnte direkt dem Chemilumineszenzdetektor zugeführt werden (GESSLER 1997).

### 2.2.1. Chemilumineszenz

Die Emission von Photonen aus einem elektronisch angeregten Zustand, der durch eine chemische Reaktion erzeugt wurde, nennt man Chemilumineszenz.

Die Chemilumineszenz kann als Umkehrung einer photochemischen Reaktion verstanden werden. Von einem energiereichen Ausgangsstoff kann nach Überwindung einer entsprechenden Aktivierungsenergie die Potentialfläche eines angeregten Zustandes erreicht werden, von wo aus durch Emission die Anregungsenergie abgegeben und die Grundzustandspotentialfläche erreicht wird.

Bei der Reaktion wird dabei mehr Energie frei, als für die Anregung des elektrischen Zustands benötigt wird ( $\Delta H_A$ : *Aktivierungsenergie*,  $\Delta H_R$ : *Reaktionsenergie*,  $\Delta E_{EX}$ : *Energie für elektronische Anregung*):

$$\Delta H_A - \Delta H_R \geq \Delta E_{EX}$$

Die Chemilumineszenzreaktion von NO mit Ozon eignet sich in besonderem Maße für die quantitative Bestimmung von gasförmigen NO, da diese außerordentlich gute Linearität, Sensitivität bis in den ppt -Bereich (v/v) sowie inhärente Spezifität aufweist. Dabei werden Photonen im langwelligen sichtbaren Spektrum (ab 600 nm) und im Infrarotbereich emittiert.

Die Intensität der Chemilumineszenz, d. h. der *Photonenfluss*, läßt sich zur quantitativen Bestimmung von NO nutzen.

Bei konstanten Reaktionsbedingungen, bezogen auf Volumen und Druck der Reaktionskammer, Temperatur und Meßgasfluß sowie bei Überschuss von Ozon, ist die beobachtbare Photonenemission proportional zur Konzentration des NO .

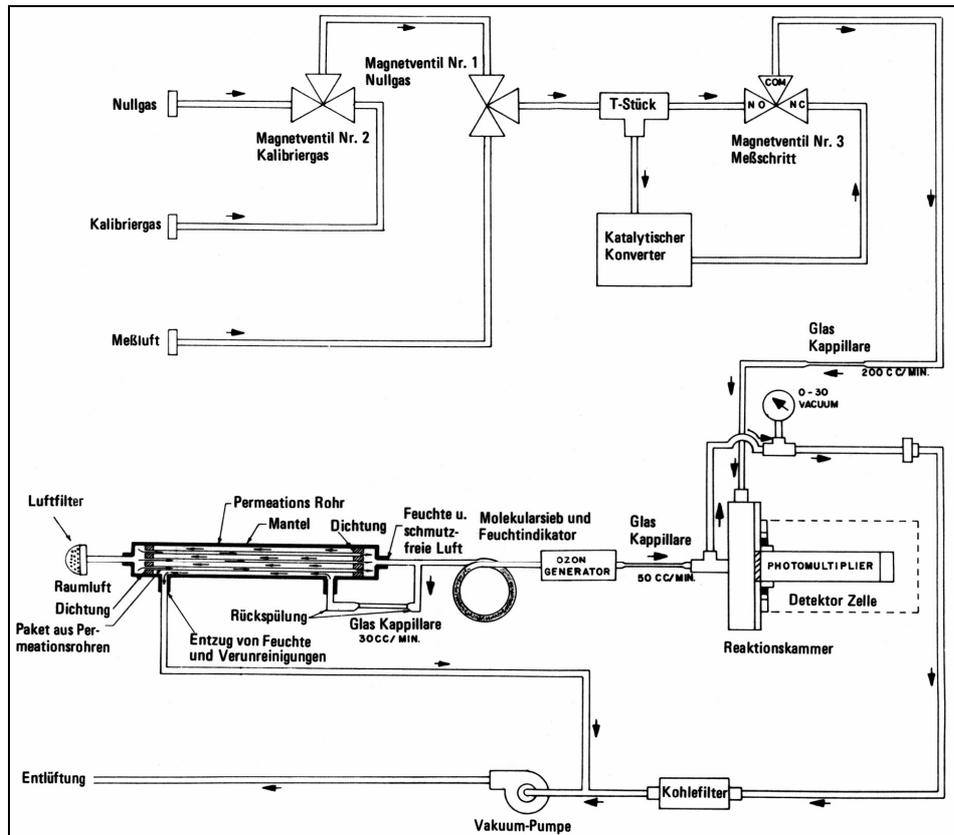


Abb. 2.1. Aufbau des Chemilumineszenzdetektors

### 2.2.2. Messprinzip zur Erfassung oxidativer Endprodukte des NO

In sauerstoffhaltigen Flüssigkeiten ist NO chemisch instabil und unterliegt rascher Oxidation. Stabile Endprodukte dieses Reaktionsweges sind Peroxynitrit ( $\text{ONNO}^{\cdot}$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^{\cdot}$ ). Diese Endprodukte werden zusammengefasst auch als  $\text{NO}_x$  bezeichnet.

Zur kontinuierlichen Erfassung dieser Oxidationsendprodukte wird von COX (1980) sowie von BRAMAN et al. (1989) eine Methode beschrieben, bei der  $\text{NO}_x$  durch ein starkes Reduktionsmittel quantitativ zu NO reduziert und anschließend mittels Chemilumineszenz detektiert wird.

Das von BRAMAN et al. als Reduktionsmittel eingesetzte V(III) besitzt gegenüber den von COX untersuchten Reagenzien (Fe(II), Mo(VI) und Ti(III)) einige substantielle Vorteile.

So reagiert V(III) erheblich schneller als Fe(II) und kann bei weit niedrigerer Säurestärke der Reaktionslösung eingesetzt werden. Außerdem können größere Mengen an Probelösung gemessen werden, da V(III) im Gegensatz zu Fe(II) nicht laufend erneuert werden muss, sondern Nitrit, Nitrat und Peroxynitrit auch in niedriger Konzentration quantitativ zu NO reduziert. Stärkere Reduktionsmittel, wie Ti(III) oder Cr(II), setzen Nitrite und Nitrate zum Ammonium-Ion um, welches der Detektion durch Chemilumineszenz entgeht (LINGANE et al., 1949, CRESSER et al., 1977).

Damit sind wesentliche Voraussetzungen gegeben, um das Meßsystem an die on-line-Messung von NO-Oxidationsprodukten in Flüssigkeiten (SPRIESTERSBACH et al., 1995) zu adaptieren.

Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. (2.2.) dargestellt. In der Reaktionskammer kommt es bei einer Temperatur von ca. 85 °C in Anwesenheit von V(III) und konzentrierter Salzsäure (0,1 M VCl<sub>3</sub> in 2 M HCl) zu folgenden Redoxreaktionen:



und weiter wie unter I. in Kapitel 2.1.

Elektronendonator ist jeweils das Reduktionsmittel V(III), das dadurch in eine höhere Oxidationsstufe übergeht.

Die Reduktion erfolgt in der beheizbaren Reaktionskammer, in deren Boden eine Gasfritte eingelassen ist. Durch die Fritte wird das inerte Trägergas N<sub>2</sub> in die Reaktionskammer geleitet. Das entstehende NO wird durch einen Jacket-Kühler und eine Kühlfalle zur Kondensation des Wasserdampfes sowie entweichender Salzsäure zum Chemilumineszenzdetektor transportiert. Die Perfusatprobe (600 µl/min) wird der Reaktionskammer mittels einer Rollerpumpe durch eine dünne Teflonkapillare zugeführt.

Gleichzeitig wird durch eine zweite Kapillare kontinuierlich Reaktionslösung entnommen, um ein Überlaufen der Kammer zu verhindern.

Das Volumen der Reaktionskammer von 150 ml ermöglicht eine lange Versuchsdauer, ohne dass die Notwendigkeit zur Erneuerung der VCl<sub>3</sub>-Lösung besteht.

Die Kalibrierung der Meßanordnung wird vor dem Versuch mit Standards bekannter Nitrat- bzw. Nitritkonzentrationen durchgeführt (GESSLER 1997).

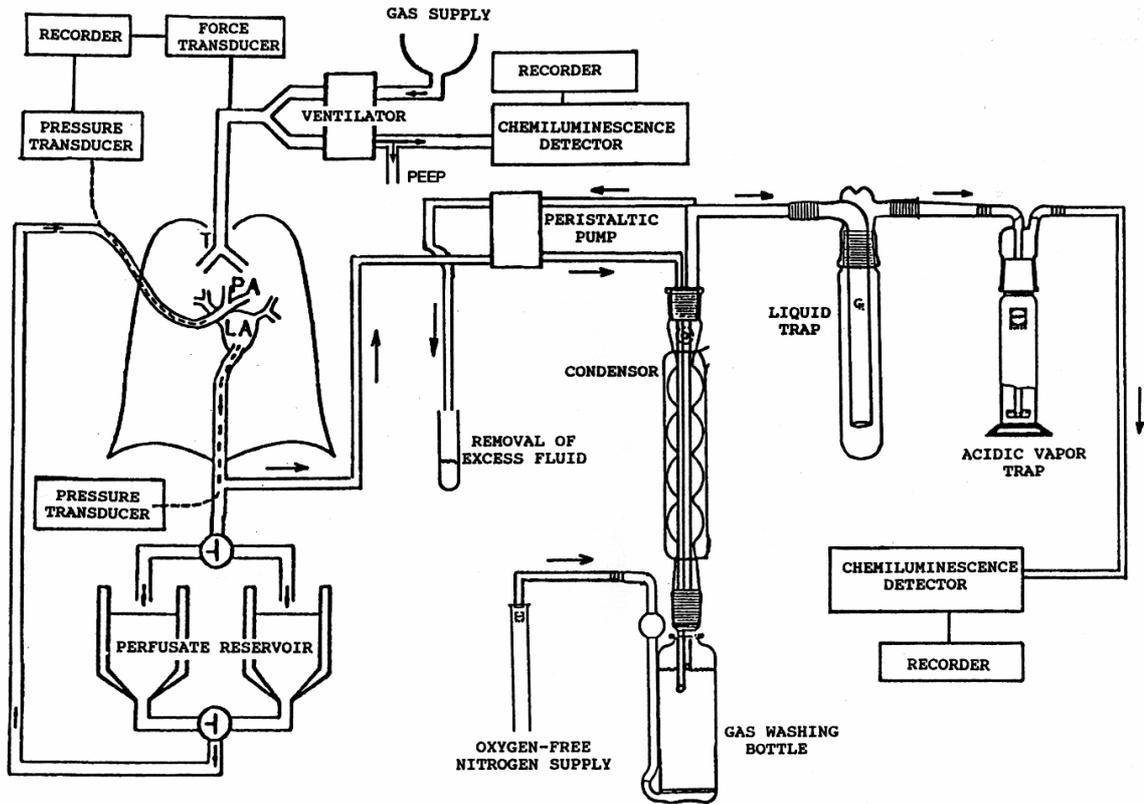


Abb. 2.2. Versuchsanordnung zur Messung des NO (Stickstoffmonoxid)

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material und Geräte für das Modell der isolierten Lunge

#### 3.1.1 2-(2-Aminoethyl)-2-thiopseudoureadihydrobromid (AETU)

[synon. S-(2-Aminoethyl)isothiourea(dihydrobromid)]

Die Erkenntnis, dass viele pathologische Zustände mit einer NO-Überproduktion einhergehen, führte zur Entwicklung einer großen Zahl an chemischen Verbindungen mit der Funktion einer NOS Inhibition. Diese Verbindungen fungieren als biologische Werkzeuge in Untersuchungen und Experimenten zur Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Wirkungsweise des NO, bzw. als ein potentes pharmakologisches Agens zu „Therapie“ dieser Pathologien.

Die Inhibitoren der katalytischen Aktivität der NOS können anhand ihres Angriffspunktes grob unterschieden werden. Außerdem werden zwei weitere Gruppen grundsätzlich unterschieden, und zwar die aminosäurebasierenden Inhibitoren und nicht-aminosäurebasierenden Inhibitoren. Die Erstgenannten werden unterschieden in die L-Arginin-Analoga, die rotationsbeschränkten Arginin-Analoga sowie die Dipeptide.

Die Gruppe der nicht-aminosäurebasierenden Inhibitoren unterscheidet sich wiederum in die Amidinverbindungen wie Guanidine, Isothioureas und Amidine, sowie in die heterozyklischen Verbindungen wie Indazole, Imidazole und Tetrahydrobiopterin-Analoga (SALERNO et al., 2002).

Die in frühen Arbeiten verwendeten Inhibitoren wie z.B. *N*-methyl-L-arginin (L-NMA) oder *N*-nitro-L-arginin (L-NNA) besaßen keine Selektivität bezüglich der einzelnen NOS-Isoenzyme. Dies hat sich jedoch mit der Entwicklung neuer Inhibitoren in den vergangenen Jahren geändert so dass nun verschiedene Verbindungen mit ausgeprägter NOS-Isoformenselektivität zur Verfügung stehen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

In der vorliegenden Arbeit fand die oben genannte und im weiteren mit AETU abgekürzte Verbindung Anwendung als diagnostisches Werkzeug. AETU stellt einen selektiven Inhibitor der iNOS dar. Die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte für iNOS betragen zwischen 0,59 µM, 8 µM und 14 µM je nach Zelltyp (GARVEY et al., 1994, WEI et al., 1998).

AETU hat die chemische Formel C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S•2HBr, das Molekulargewicht beträgt 281,0, der Schmelzpunkt liegt bei ca. 190°C.

AETU gehört zur Gruppe der Isothioureas (S), die zusammen mit den Guanidinen (N) zur Gruppe der Amidinverbindungen gerechnet werden. In dieser Substanzgruppe ist ein Carbamidincarbon mit einem Stickstoffatom (Guanidine), einem Schwefelatom (Isothioureas) oder einem weiteren Kohlenstoff (sog. einfache Amidine) verbunden.

Bei der Verwendung als Inhibitoren der NOS sind diese Substanzen grundsätzlich von den Aminosäureanaloga abzugrenzen.

Die Isothioureas stellen hochselektive Inhibitoren der iNOS-Aktivität dar (GARVEY et al., 1994). AETU hemmt die Translation (t-RNA-Blockade) und führt zur schnellen Degradation des iNOS-Proteins (RUETTEN et al., 1996, WIE et al., 1998). Die inhibitorische Wirkung von AETU ist 30-100 fach potenter als die von Argininanaloga ( N-Methylarginin, N-Nitroarginin u.a. ) oder von Aminoguanidin.

Die klinische Verwendbarkeit der Isothiourea-Verbindungen zeigte sich durch die schlechte Zellpenetration und die systemische Toxizität beeinträchtigt (TRACEY et al., 1995). Eine Verbesserung in dieser Hinsicht brachte die Entwicklung der Aminoalkylisothioureas wie u. a. AETU (SOUTHAN et al., 1996).

### 3.1.2. Gase, Chemikalien und Pharmaka

2-(2-Aminoethyl)-2-thiopseudoureadihydrobromid (AETU), Calbiochem (Bad Soden)

N<sup>G</sup>- monomethyl-L-arginin (L-NMMA), Calbiochem (Bad Soden)

LPS (Lipopolysaccharid) von *Salmonella abortus equi*; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. C. Galanos, MPI f. Immunologie (Freiburg)

*E. coli*-Hämolysin, vorbereitet und bereitgestellt von S. Bhakdi, Universität Mainz.

Aqua destillata, B Braun (Melsungen)

BM 13.505 (Daltroban) Boehringer-Mannheim (Mannheim)

Ketanest<sup>®</sup> 50 (50 mg/ml), Parke-Davis (Berlin)

Kohlendioxid 4,5, Messer-Griesheim (Siegen)

Krebs-Henseleit-Puffer, Serag Wiessner AG (Naila)

L-Argininhydrochlorid 1-M Pfrimmer, Pharmacia GmbH (Erlangen)

Liquemin<sup>®</sup> N 25.000 (5.000 I.E./ml Na-Heparin), Hoffman La Roche AG (Grenzach-Wyhlen)

Natriumchlorid-Spüllösung (NaCl 0,9 %), B Braun (Melsungen)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) 8,4, B Braun (Melsungen)

Sauerstoff 4.5, Messer-Griesheim (Siegen)

Sauerstoff 5.0, Messer-Griesheim (Siegen)

Stickstoffmonoxid 800 ppm und 1600 ppm, Messer-Griesheim (Siegen)

Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer AG (Leverkusen)

Xylocain<sup>®</sup> 2%, Astra Chemicals (Wedel)

### 3.1.3. Geräte

Adapter Combifix<sup>®</sup>, B Braun (Melsungen)  
AD/DA-Wandlerkarte, Decision  
Beatmungspumpe 6025, Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)  
Druckaufnehmer Combitrans<sup>®</sup>, B Braun (Melsungen)  
Edelstahlrohre VSR 80 (Innendurchmesser 2,06 und 4 mm), Oststeinbek  
Frigomix<sup>®</sup> U, B Braun (Melsungen)  
Gasdurchflußmesser SNAP-IN 10A6132/42, Bailey-Fischer& Porter (Göttingen)  
Gasmischanlage KM 60-4 ME SO, Witt (Witten)  
Grafik- und Datenerfassungsprogramm Labtech Notebook Pro, © 1994 Laboratory Technologies Corp. (Wilmington, USA)  
Infusionspumpe IVAC 531-1, Ivac Infusion Pump Inc. (San Diego, USA)  
Kugelhähne 2-Wege (SS-43S6MM) und 3-Wege (SS-43XSS6M), B.E.S.T. (Frankfurt)  
Mehrfachschreiber Servomed, Hellige (Freiburg)  
Pall-Filter SQ40S, Pall (Dreieich)  
pH-Elektrode Inlab<sup>®</sup> 418, Mettler-Toledo (Steinbach)  
pH-Meter Delta<sup>®</sup> 345, Mettler-Toledo (Steinbach)  
Rollerpumpe Masterflex<sup>™</sup> 7518-10, Masterflex Inc. (Barrington,USA)  
Thermomix<sup>®</sup> B, B Braun (Melsungen)  
Thermomix<sup>®</sup> UB, B Braun (Melsungen)  
Ultraschall-Flußmesser T101, Transonic System Inc. (Ithaka, USA)  
Wägezelle U1-G, Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen)

## 3.2. Material und Geräte für die Chemilumineszenzmessung

### 3.2.1. Materialien

Aktivkohle, Fluka AG (Bern, Schweiz)

Aqua destillata, B Braun (Melsungen)

Glasgefäß beheizbar (150 ml) mit Glasfritte (Porengröße 3), Kalensee (Gießen)

Glaskolben 2-halsig, Kalensee (Gießen)

Jacket Intensivkühler, Kalensee (Gießen)

Kühlfalle (100 ml), Kalensee (Gießen)

Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) pro analysi, Merck (Darmstadt)

Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) pro analysi, Merck (Darmstadt)

Pumpenschläuche Tygon (Innendurchmesser 0,95 und 2,06 mm), Kalensee (Gießen)

Salzsäure 37% pro analysi, Merck (Darmstadt)

Sauerstoff 4.5, Messer-Griesheim (Siegen)

Stickstoff 5.0, Messer-Griesheim (Siegen)

Stickstoffmonoxid 109 ppb und 800 ppm, Messer-Griesheim (Siegen)

Teflonfilter

Vanadium(III)-Chlorid, Merck (Darmstadt)

### 3.2.2. Geräte

Chemilumineszenzdetektor UPK 3100, UPM (Langgöns)

Infusionsrollerpumpe ISMATEC IP 12 SA 8031, Ismatec (Zürich, Schweiz)

Injektomat, Ismatec (Zürich, Schweiz)

Membran-Vakuumpumpe S/N 103473, UPM (Langgöns)

Mikrometer-Ventil, Messer-Griesheim (Siegen)

Thermomix® BU, B Braun (Melsungen)

Umwälzpumpe Little Giant™, Little Giant Pump Co. (Oklahoma City, USA)

### **3.3. Modell der isolierten Lunge**

#### **3.3.1. Einführung**

Das Modell der isolierten Lunge wurde bereits 1912 von KNOWLTON und STARLING beschrieben. In unserem Laborbereich ist das Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge schon seit Jahren etabliert. Mit leichten Modifikationen an die jeweilige Fragestellung bietet das Modell der isolierten Lunge als blutfrei perfundiertes, ventilertes und isoliertes Organ ein von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges experimentelles System (SEEGER et al., 1994).

Mit dem Modell können komplexe biochemische Interaktionen, physiologische und biophysikalische Parameter, sowie gezielt induzierte pathologische Zustände untersucht werden (SEEGER et al., 1994).

Es ermöglicht neben der kontinuierlichen Meßdatenerfassung des pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Druckes, des Beatmungsdrucks und des Lungengewichtes, die Entnahme von Proben aus der Expirationsluft und aus dem zirkulierenden Perfusat zur chemischen und biochemischen Analyse.

3.3.2. Versuchsaufbau

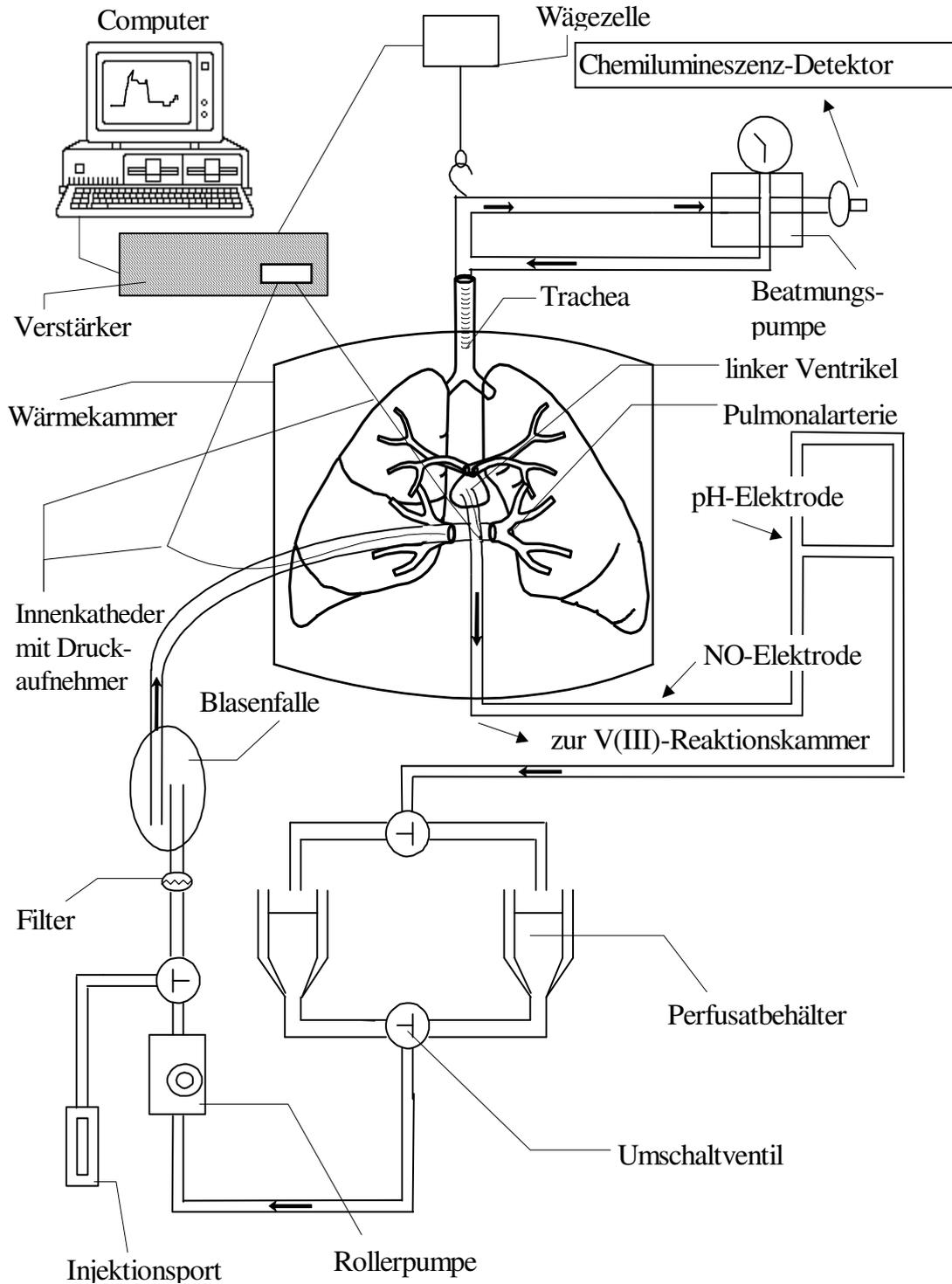


Abb. 3-3 Schematische Darstellung des Modells der isolierten Kanninchenlunge sowie des Einbaus der NO-Meßanalytik (Erklärung siehe Text)

Bei dem verwendeten Versuchsaufbau werden die Lungen in einer feuchten Kammer an einer Wägezelle (Hottinger Baldwin Meßtechnik, Darmstadt) frei aufgehängt. Die Perfusion erfolgt flusskonstant mittels Schlauch-Rollerpumpe (Cole-Palmer,USA) bei pulsierendem Flow.

In den geschlossenen Perfusionskreislauf können alternierend zwei Vorratsbehälter mit je 300 ml Volumen über Dreiwegehähne eingeschaltet werden. Das gesamte Perfusionssystem wird nach mehreren Spülvorgängen luftblasenfrei gefüllt. Um arterielle Embolien sicher zu verhindern, passiert das Perfusat zudem nach der Rollerpumpe einen Pall-Filter (Porengröße 40 µm) und eine Blasenfalle. Nach Passage der Lunge fließt das Perfusat über einen in der linken Herzkammer fixierten Schlauch und eine leiterförmige Kaskade zurück zum Vorratsbehälter. Durch das Abklemmen einzelner Sprossen der Kaskade ist es möglich, den hydrostatischen Druck auf das venöse pulmonale Gefäßsystem zwischen 0 und 10 cm Wassersäule (Bezugspunkt Lungenhilus) zu variieren. Der arterielle Katheter zur Druckmessung wird bis in die Pulmonalarterie vorgeschoben, der venöse Katheter unmittelbar am Lungenausgang fixiert.

Die Vorratsbehälter und die die Lunge umgebende Kammer waren aus doppelwandigem Glas hergestellt. Durch Spülung mit gekühltem oder erwärmtem Wasser konnte die Temperatur des Perfusats und der Kammerluft durch eine Pumpe mit Heiz- und Kühleinrichtung (Thermomix® UB, Frigomix® UB) eingestellt werden.

Die Perfusion erfolgte mit sterilem Krebs-Henseleit-Puffer (Serag-Wiessner AG) mit folgender Zusammensetzung:

NaCl	1,32 mM
KCl	4,39 mM
CaCl	2,37 mM
MgCl	1,33 mM
Glucose	15,30 mM

Durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> (Elektrolytkonzentrat 8,4 BRAUN) wurde ein pH-Wert von 7,32 - 7,40 in der rezirkulierenden Pufferlösung (Messung direkt nach dem Austritt aus dem linken Ventrikel) eingestellt.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

Die verwendeten Lungen zeigten alle eine weiße, homogene Oberfläche. Zeichen einer Hämostase, Atelektase oder Ödembildung lagen nicht vor.

Die Perfusion erfolgte initial mit einem Fluss von 10 ml/min bei einer Temperatur von 4°C. Nach langsamer Steigerung des Flusses und der Temperatur auf eine maximale Perfusionsgeschwindigkeit von 100 ml/min, bzw. einer physiologischen Temperatur von 37,8 °C, blieb die isolierte Lunge für zunächst 30 min vor Versuchsbeginn völlig gewichts- und druckstabil (steady-state -Phase).

Die Beatmung der Lunge erfolgte durch eine Beatmungspumpe (V, Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik). Die Ventilationsparameter während des Versuches waren:

Atemzugvolumen:           30 ml  
Atemfrequenz:             30 min<sup>-1</sup>  
Endexpiratorischer Druck: 1 mm Hg

Die Atemgasspeisung der Pumpe bestand zunächst aus Raumluft (bis zur Unterbrechung des Blutflusses durch die Lunge) und erfolgte dann mit einem durch eine Gasmischanlage (KM 60-4 ME SO, WITT) variierbaren Gasgemisch. Dieses konnte in einem Bereich von 0-25 % für O<sub>2</sub> 0-25% für CO<sub>2</sub> und jeweils 0-100 % für N<sub>2</sub> bzw. NO verändert werden.

Nach Beendigung des Versuches erfolgte eine mechanische und chemische Reinigung des Schlauchsystems und eine anschließende Sterilisation mit Formaldehyd. Die Vorratsbehälter wurden durch Hitze (200 °C) über 4 Stunden sterilisiert.

#### 3.3.3. Präparation der isolierten Lunge

Die Präparation der Lunge gliederte sich in Narkoseeinleitung, Tracheotomie, Narkosevertiefung und Lungenpräparation.

Verwendet wurden Tiere beiderlei Geschlechts der Rasse New Zealand White Bastard mit einem Körpergewicht zwischen 2,3 und 2,9 kg.

Zur Narkoseeinleitung wurden 400 µl eines Gemisches aus Ketamin (Ketanest®) und Xylazin (Rompun®) im Verhältnis 2:3 in eine randständige Ohrvene injiziert.

Danach wurde das Kaninchen mit 1000 I.E. Heparin (Liquemin®) antikoaguliert. Bei erhaltener Spontanatmung wurde das Kaninchen auf den Rücken gelagert und der Bereich zwischen Trachea und oberer Thoraxapertur mit 5 ml 2% Xylocain anästhesiert. Das Präparationsgebiet über Thorax und Abdomen wurde freigeschoren und mit Hautdesinfektionsmittel (Braunoderm®) behandelt.

Danach konnte die Trachea schmerzfrei durch schichtweises Freipräparieren, unter Schonung der großen Halsgefäße und des Nervus Vagus, mobilisiert werden. Nach Anfertigung eines Tracheostomas wurde ein Tubus nach endotracheal vorgeschoben und dort fixiert .

Die Beatmung erfolgte initial mit Raumluft, einem Hubvolumen von 30 ml, einer Frequenz von 30 min<sup>-1</sup> und einem endexpiratorischen Druck von 0 mm Hg.

Die Narkose wurde anschließend durch sukzessive Gabe des Narkotikagemisches unter Kontrolle der Herz - und Kreislauffunktion bis zur völligen Schmerzfreiheit und Relaxation vertieft.

Daraufhin konnte die Haut über dem Sternum, den Rippenbögen und dem Abdomen weiträumig mobilisiert werden.

Es erfolgte eine quere Oberbauchlaparotomie über eine Inzision kaudal des Sternums und über zwei weit in die Flankengegend reichende Schnitte entlang der Rippenbögen. Eine am Processus xiphoideus fixierte Klemme, nach cranial und oben gezogen, erleichterte diese Präparationsschritte und ermöglichte eine gute Darstellung des Zwerchfells. Nach Durchtrennung des Zwerchfellansatzes wurde der Thorax unter leichtem Zug eröffnet. Mit dem Einreißen der Pleura kollabierte die Lunge. Nach Ablösen des Zwerchfells entlang der unteren Apertur wurde der Thorax durch eine Längssternotomie komplett eröffnet.

Der Thymus wurde stumpf entfernt, das Pericard eröffnet und vorsichtig entfernt. Aorta und Pulmonalarterie wurden mit einem Faden angeschlungen.

Es folgten die Umstellung der Beatmung auf das Gasgemisch (16,5% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, 78,2% N<sub>2</sub>), die sofortige Inzision der Pulmonalarterie kurz vor dem Ausgang des rechten Ventrikels sowie das Einbinden eines Katheters (Innendurchmesser 3 mm) in die Pulmonalarterie.

Um Luftembolien in der pulmonalen Strombahn zu verhindern, war der Katheter mit auf 4 °C gekühltem Perfusat vorgefüllt und die Perfusion bereits vor dem Einbinden mit einem Fluss von 10 ml/min angestellt.

Es folgte die Resektion des unteren Pols des linken Ventrikels, um den freien Abfluss des Perfusates nach der Lungenpassage zu gewährleisten und somit eine Druckbelastung der Lungenstrombahn zu verhindern. Danach wurde die Aorta ligiert.

Nach Durchtrennung der Venae cavae inferior et superior sowie der Aorta konnte das Herz-Lungen-Präparat unter vorsichtiger Lösung des mediastinalen Bindegewebes explantiert werden.

Zur weiteren Präparation wurde das Organ an einem Stativ befestigt.

Der rechte Ventrikel sowie die Papillarmuskeln wurden entfernt. Mit einer Ligatur wurde das linke Herzohr aus dem Kreislauf ausgeschaltet. Schließlich erfolgte die Fixation eines in den linken Herzventrikel eingebrachten Katheters (Innendurchmesser 6 mm) durch eine intramurale Tabaksbeutelnaht.

Danach konnte das Zirkulationssystem geschlossen und die Lunge im Äquilibrationsgefäß an der Wägezelle aufgehängt werden.

#### **3.3.4. Aufwärmphase und Kalibrierung der Meßeinrichtung**

Während der Aufwärmphase wurde die Perfusion schrittweise bis auf den vorgesehenen Endwert von 100 ml/min gesteigert. Danach wurde der linksventikuläre (venöse) Druck mittels der höhenverstellbaren Kaskadenvorrichtung auf 2 mm Hg eingestellt. Gleichzeitig wurde der pH-Wert des Perfusats gemessen und ggf. durch Veränderung der CO<sub>2</sub>- Zufuhr in den Grenzen zwischen pH 7,30 und pH 7,40 konstant gehalten.

Die permanente Registrierung des Lungengewichtes geschah durch eine elektronische Wägezelle (Hottinger Baldwin Meßtechnik).

Eine Kalibrierung der Wägezelle mit bekannten Gewichten erfolgte zu Beginn jedes Versuches.

Zur kontinuierlichen Messung des pulmonalarteriellen und linksatrialen Druckes wurden mit Flüssigkeit gefüllte Innenkatheter (Innendurchmesser 1 mm) mit ihrer Spitze direkt an die Meßstelle (Pulmonalarterie, linker Vorhof) gebracht und mit einem elektromagnetischen Druckwandler (PT, Combitrans®) verbunden. Der Bezugspunkt für den Nullabgleich der Druckaufnehmer war die Höhe des Lungenhilus. Durch Anheben des linksatrialen Druckes auf +2 mm Hg konnten Zone-3-Bedingungen nach WEST (1977) für alle Lungenbezirke während der Expiration sichergestellt werden.

Die Registrierung des Gewichtes und der Drücke erfolgte über einen Hellige-Mehrkanalschreiber. Die Daten wurden mittels einer AD/DA- Wandlerkarte on-line auf einen Personalcomputer übertragen und graphisch dargestellt (Labtech Notebook Pro™).

### 3.4. Bestimmung der Aktivität des Escherichia coli Hämolysins (HlyA)

Die Bestimmung der Aktivität des in den verschiedenen Versuchen eingesetzten HlyA aus verschiedenen Chargen gelang mittels eines semiquantitativen Testes.

Direkt nach dem Einsatz im Versuch wurden 10 µl HlyA in einer Verdünnungsreihe von 1/10 bis 1/20480 in Zweiserschritten in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. 50 µl jeder Verdünnungsstufe und 50 µl einer 10%igen Kaninchen-Erythrocytensuspension inkubierten im Wasserbad bei 37 °C über eine Stunde unter ständiger Bewegung. Die Herstellung der Suspension erfolgte über das mehrmalige Waschen von Kaninchenerythrocyten in 0,9%iger NaCl-Lösung und anschließender Verdünnung. Nach Zentrifugation konnten 10 µl des Überstandes in ein Loch einer Mikrotiterplatte mit 90 µl 0,9%iger NaCl pipettiert werden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 405 nm. In halblogarithmischer Darstellung gegen die Verdünnungsstufen aufgetragen, erlaubte sie die grafische Bestimmung des 60 % igen Wertes der vollen Hämolyse und das Ablesen der entsprechen Verdünnungsstufe (Titers).

Eine hämolytische Einheit (HU) ist definiert als die Konzentration, die eine 60%ige Hämolyse einer 10%igen Erythrozytensuspension auslöst. Aus dem Quotienten des Verhältnisses des im Versuch eingesetzten Aliquots HlyA zum Perfusatvolumen und des

ermittelten Titers berechnete sich die HlyA-Konzentration in HU/ml:  $\frac{\mu\text{l Hly}}{\mu\text{l Perfusat}} \div \text{Titer}$ .

### **3.5. Integration der Meßanalytik in das Modell der isolierten Lunge**

#### **3.5.1. Einbau des Chemilumineszenzdetektors für die Atemgasanalyse**

Die Entnahmestelle zur Analyse des NO-Gehaltes der Expirationsluft lag unmittelbar hinter dem PEEP-Ventil. Eine Entnahme näher an der Lunge war nicht möglich, da sonst der positive endexpiratorische Druck nicht hätte aufrechterhalten werden können. Ein T-förmig an den PEEP angeschlossener Überlauf (PVC-Schlauch der Länge 5 m mit einem Innendurchmesser von 1,0 cm) stellte ein ausreichend großes Reservoir dar, um trotz diskontinuierlicher Ausatmung ein Vermischen der Expirations- und Raumluft zu verhindern.

Insgesamt betrug das Volumen der Expiration 900 ml/min, das Meßgasvolumen 200 ml/min.

#### **3.5.2. Einbau der Analytik für die NO<sub>x</sub>-Messung aus dem Perfusat**

Zur Messung der oxidativen Endprodukte des NO wurde dem zirkulierenden Perfusat mittels einer Rollerpumpe (ISMATEC IP 12) kontinuierlich ein Probenvolumen von 600 µl/min entnommen und der Vanadium(III)-Kammer zugeführt. Die kontinuierliche Probenentnahme erfolgte durch eine Kanüle aus dem venösen Schenkel des Schlauchsystems.

Gleichzeitig wurde das entnommene Perfusatvolumen ersetzt, um eine Abnahme des Perfusats zu vermeiden. Dies geschah durch Zuführen von frischer Pufferlösung durch eine Infusionspumpe (IVAC 531-1).

Zu beachten war die Verzögerungszeit (4 min) zwischen Entnahme und Messung, bedingt durch die Zuleitung des Perfusats in die Kammer, durch die Reaktionszeit sowie durch die Zuführung des entstandenen NO zum Detektor.

### 3.6. Ausgangsbedingungen

Jeder Versuch beginnt mit einer „steady-state“ Phase von 30 Minuten Dauer. Pulmonalarterieller Druck, venöser Druck, Perfusionsfluss und Lungengewicht sind während dieser Zeit konstant und werden neben der exhalativen sowie intravasalen NO-Freisetzung über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich gemessen.

Die erforderlichen Ausgangsbedingungen für den Versuchsablauf sind:

- die verwendeten Lungen haben eine weiße, homogene Oberfläche
- die Lungen sind frei von Hämostasezeichen, Ödemen oder Atelektasen
- der pulmonalarterielle Druck liegt zwischen 5 bis 8 mmHg
- die Gewichtszunahme beträgt deutlich weniger als 1 g/h.

Damit beginnt die Messung der NO-Liberation in die Atemluft und ins Perfusat sowie das 180- minütige LPS-„Priming“, bzw. die Langzeit-iNOS-Hemmung. Nach 170 Minuten erfolgt je nach Versuchsmodus die Kurzzeit-iNOS-Hemmung oder die Zugabe des Thromboxan A<sub>2</sub>-Antagonisten BM 13.505.

Am Zeitpunkt „0“ erfolgt schließlich die Stimulation mit E. coli-Hämolysin (HlyA).

Das Versuchsprotokoll zeigt Abbildung 1 (Abb 1.).

### 3.7. Versuchsgruppen

#### 3.7.1 LPS-“Priming“ und Exotoxin-Stimulation (HlyA)

**Gruppe I a:** 180-minütige Perfusion der Lungen mit oder ohne LPS und jeweils anschließende Stimulation mit HlyA (n= 5-8 unabhängige Versuche für jede Untergruppe).

- Kontrolle: Lösungsmittel (-180 min) + 0.036 HU/ml HlyA
- LPS (10 ng/ml, -180 min) + 0.036 HU/ml HlyA

**Gruppe I b:** 180-minütige Perfusion mit oder ohne LPS, dann HlyA-Stimulation bei Anwesenheit von BM 13.505 (TxA<sub>2</sub>-Antagonist), (n= 4-5 für jede Untergruppe).

- Lösungsmittel (-180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5 µmol/l, -10 min)
- LPS (10 ng/ml, -180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5 µmol/l, -10 min)

**Gruppe I c:** wie Gruppe I b, zusätzlich Anwesenheit von Serum (1%) (n= 4-5 für jede Untergruppe).

- Lösungsmittel (-180 min) + Serum (1%, -180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5 µmol/l, -10 min)
- LPS (10 ng/ml, -180 min) + Serum (1%, -180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5 µmol/l, -10 min)

**Gruppe I d:** wie Gruppe I b, zusätzlich Anwesenheit von Dexamethason (1 mg) (n= 4-5 je Untergruppe).

- Lösungsmittel (-180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + DEX (1 mg, -185 min)
- LPS (10 ng/ml, -180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + DEX (1 mg, -185 min) + BM 13.505 (5 µmol/l, -10 min)
- LPS (10 ng/ml, -180 min) + 0.036 HU/ml HlyA + DEX (1 mg, -185 min)

### **3.7.2 Einfluß einer Langzeit-Hemmung der iNOS**

In dieser Versuchsreihe wurde die dosisabhängige Wirkung des selektiven iNOS-Inhibitor AETU, bzw. des Glucokortikoids Dexamethason, auf die basale und stimulierte (durch HlyA) NO-Freisetzung untersucht.

Die Zugabe von AETU (1, 5, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) und Dexamethason (1 mg) erfolgte jeweils 5 Minuten vor dem Beginn der 180-minütigen Perfusion mit LPS-Zusatz.

#### ***Gruppe II a*** (n= 4-5 Versuche je Untergruppe)

- Lösungsmittel (-180 min) + AETU ( 1, 5 od. 10  $\mu\text{M}$ , -185 min) + 0.036 HU/ml HlyA
- Lösungsmittel (-180 min) + DEX. ( 1 mg, -185 min) + 0.036 HU/ ml HlyA
- Lösungsmittel (-180 min) + AETU (5  $\mu\text{M}$ , -185 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5  $\mu\text{mol/l}$ , -10 min)

#### ***Gruppe II b*** (n= 4-5 Versuche je Untergruppe)

- LPS (10 ng/ml, -180 min) + AETU (1, 5 od. 10  $\mu\text{M}$ , -185 min) + 0.036 HU/ml HlyA +BM 13.505 (5  $\mu\text{mol/l}$ , -10 min)
- LPS (10 ng/ml, -180 min) + DEX. (1 mg, 185 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5  $\mu\text{mol/l}$ , -10 min)

### **3.7.3 Einfluß einer kurzzeitigen iNOS-Hemmung**

In dieser Versuchsreihe wurde der Effekt einer kurzfristigen Hemmung der iNOS am Ende der „Priming“-Phase untersucht. Die Zugabe von AETU (5 µmol/l) ins rezikulierende Perfusat erfolgte 20 Minuten vor Stimulation mit HlyA.

*Gruppe III* (n= 4-5 je Untergruppe)

- Lösungsmittel (-180 min) + AETU (5 µmol/l, -20 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505 (5 µmol/l, -10 min)
- LPS (-180 min, 10 ng/ml) + AETU (5 µmol/l, -20 min) + 0.036 HU/ml HlyA + BM 13.505( 5 µmol/l, -10 min)

### **3.8. Statistische Analyse:**

Die Versuchsdaten aus dem Organmodell werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Es erfolgt eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Ein Wert von  $p < 0,05$  wird als signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. LPS-Priming

Unter Ausgangsbedingungen liegt der pulmonalarterielle Druck (PAP) zwischen 5 und 9 mm Hg. Ein signifikanter Anstieg oder Abfall ist während der 180-minütigen Vorbehandlung mit Lipopolysaccharid (10 ng/ml) („Priming-Phase“) nicht zu verzeichnen. Die Zunahme des Lungengewichtes beträgt über 3 Stunden in allen Versuchsgruppen weniger als 4 g.

Die Perfusion der Lunge unter Zugabe von LPS, mit oder ohne Zusatz von 1% Kaninchenserum, bewirkt keine signifikante Abweichung der Hämodynamik oder des Flüssigkeitsgleichgewichtes der Lunge über den Zeitraum von 180 Minuten im Vergleich zu den Kontrollversuchen.

Ebenso ergeben sich hierin keine Änderungen bei Zugabe von Dexamethason (DEX) oder des selektiven iNOS- Inhibitors AETU.

Die messbare exhalative Freisetzung von NO bewegt sich am Beginn der Priming-Phase zwischen 50 und 70 ppb.

Über den Versuchszeitraum von 3 Stunden ist ein geringer exhalativer NO-Abfall, im Mittel von 3.8 ppb pro Stunde, festzustellen. Dieser leichte Abfall zeigt sich durch die Zugabe von LPS, AETU, DEX oder Kombinationen der Inhibitoren mit LPS nicht signifikant beeinflusst.

## 4.2. Stimulation mit *E. coli*-Hämolyisin

### 4.2.1 Stimulation mit *E. coli*-Hämolyisin ohne Priming

Die Injektion von HlyA in die Pulmonalarterie von Lungen, die nicht mit LPS vorbehandelt wurden, führt zu einer unmittelbaren und anhaltenden Druckantwort, die ihren Gipfel mit einem PAP-Anstieg von  $\Delta P = 20.8 \pm 3.8$  mm Hg nach 10 Minuten erreicht (Fig 2 a).

Diese Versuche sind wegen ausgeprägter Ödembildung im Mittel nach 14 Min. beendet (Fig. 2 b). Parallel dazu steigt die exhalative und intravasale NO-Freisetzung. Diese erreicht ihren Höhepunkt nach 2 - 3 Minuten bei Werten von  $53.2 \pm 5.3$  ppb und fällt dann ab. Die intravasale NO Freisetzung beträgt  $0.265 \pm 0.029 \mu\text{mol} \times (1 \times 3 \text{ min})^{-1}$  (Fig. 2 c und Fig. 2 d).

### 4.2.2 Stimulation mit *E. coli*-Hämolyisin bei LPS-Priming

LPS-Priming führt zu einer dramatisch gesteigerten Druckreaktion auf die HlyA-Stimulation ( $\Delta P = 39.4 \pm 2.7$  mmHg)(Fig. 2 a).

Begleitend kommt es zur massiven Ödembildung, aufgrund derer das Experiment innerhalb weniger Minuten beendet wird. Die Exotoxin-bedingte NO-Exhalation ist in diesen Experimenten signifikant reduziert. Die maximale Zunahme der NO Exhalation über das Ausgangsniveau fällt von  $53.2 \pm 5.3$  ppb (Gruppe Ia, HlyA-Stimulation nach 180 Minuten ohne LPS, Fig. 2 c) auf  $29.4 \pm 4.8$  ppb (Gruppe Ib, HlyA-Stimulation nach 180 Minuten mit LPS, Fig 2 c).

Die HlyA-bedingte intravasale NO-Freisetzung fällt von  $0.265 \pm 0.029 \mu\text{mol} \times (1 \times 3 \text{ min})^{-1}$  (Gruppe Ia) auf  $0.1325 \pm 0.042 \mu\text{mol} \times (1 \times 3 \text{ min})^{-1}$  (Gruppe Ib).

### 4.2.3 Tx-Rezeptor Blockade

Wie erwartet, werden Druckerhöhung und Gewichtszunahme durch Ödembildung bei Zusatz des Tx-Antagonisten BM 13.505 signifikant vermindert und dies sowohl bei HlyA-Stimulation ohne LPS als auch bei Stimulation nach LPS-Priming. Diese Versuche können alle über den vollen Beobachtungszeitraum bis 30 Minuten nach HlyA-Stimulation ausgewertet werden. Der PAP-Anstieg beträgt  $\Delta P = 7.4 \pm 0.4$  mm Hg mit dem Gipfel nach zwei Minuten bei Stimulation unter Tx-Blockade bzw.  $\Delta P = 4.9 \pm 0.2$  mm Hg bei Stimulation unter Tx-Blockade bei LPS-Priming (Fig. 2 a).

Die exhalative und intravasale NO-Freisetzung dagegen bleibt durch die Thromboxan Rezeptor Blockade mit BM 13.505 unbeeinflusst. (*NO-intravasal: HlyA ohne BM*  $0.265 \pm 0.029 \mu\text{mol} \times (1 \times 3\text{min})^{-1}$ ; *HlyA mit BM*  $0.254 \pm 0.1304 \mu\text{mol} \times (1 \times 3\text{min})^{-1}$ ). Die Versuche zur exhalativen NO-Messung zeigen für die Versuche HlyA allein und HlyA mit BM einen nahezu identischen Kurvenverlauf (Fig. 2 c). BM bei LPS-Priming führt zu einer gesteigerten exhalativen NO-Freisetzung von  $35.4 \text{ ppb} \pm 3.3 \text{ ppb}$  gegenüber  $29.4 \text{ ppb} \pm 4.75 \text{ ppb}$ . Diese Werte bleiben aber signifikant unter dem Niveau der Versuche ohne LPS (*HlyA allein*  $53.2 \text{ ppb} \pm 5.3 \text{ ppb}$ ; *HlyA + BM*  $54.0 \text{ ppb} \pm 5.9 \text{ ppb}$ ).

Die Ödembildung fällt mit einer Gewichtszunahme von unter 1 Gramm innerhalb von 20 Minuten für Versuche HlyA mit BM und Versuche HlyA mit LPS und BM sehr gering aus (Fig. 2 b).

### 4.3. Einfluß von Dexamethason

#### Versuchsgruppen Ia und Ib

Die Experimente der Gruppe HlyA+ DEX (ohne LPS) zeigen keinen Unterschied zu den Versuchen mit HlyA allein. Die Zunahme der NO Exhalation auf HlyA-Stimulation beträgt  $52.6 \pm 6.8$  ppb, unter HlyA+ DEX beträgt die Zunahme  $55.75 \pm 2.1$  ppb (Fig. 4 c). Die Zunahme der intravasalen NO Freisetzung beträgt auf HlyA  $0.248 \pm 0.003 \mu\text{mol} \times (1 \times 3 \text{ min})^{-1}$  und auf HlyA+ DEX  $0.253 \pm 0.017 \mu\text{mol} \times (1 \times 3 \text{ min})^{-1}$ . Lediglich in der Druckantwort auf HlyA unterscheiden sich beide Versuchsreihen deutlich. Nach HlyA-Applikation erfolgt eine Druckreaktion mit einem Maximalanstieg nach 10 Minuten um  $\Delta P = 20.8 \pm 4.8$  mm Hg. Die Versuche mit DEX zeigen auf HlyA eine Druckreaktion bis maximal  $\Delta P = 8.57 \pm 1.5$  mm Hg (Fig. 4 a).

Dexamethason verhindert nicht den exorbitanten Druckanstieg und die rasche Gewichtszunahme auf HlyA-Stimulus nach LPS-Priming. Die Experimente der Gruppe HlyA+LPS+DEX verlaufen ähnlich den Versuchen ohne DEX und werden wegen deutlicher Gewichtszunahme vorzeitig beendet (nach 5 Minuten, siehe Fig. 4 a).

Es zeigt sich jedoch ein deutlicher Anstieg der exhalativen NO-Freisetzung auf den HlyA-Stimulus. Im Vergleich zur Versuchsgruppe HlyA+LPS stieg die NO-Exhalation von  $29.4 \pm 4.8$  ppb auf  $39.3 \pm 8.2$  ppb. Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn die Tx-vermittelte Druckreaktion und Ödembildung durch BM 13.505 verhindert wurde (NO-Exhalation:  $64.5 \text{ ppb} \pm 1.1$ ). Die durch LPS verursachte Hemmung der exhalativen NO-Freisetzung war hier vollständig umkehrbar (Fig. 4 a).

#### 4.4. Langzeit- und Kurzzeithemmung der iNOS mit 2-(2-Aminoethyl)-2-thiopseudourea-dihydrobromid (AETU)

Die Zugabe des iNOS-Inhibitors AETU am Beginn des Versuches beeinflusst nicht die exhalative NO-Freisetzung auf HlyA-Stimulus im Vergleich zur Kontrollgruppe (HlyA ohne AETU). Eine Dosisabhängigkeit besteht bezüglich der exhalativen NO-Freisetzung nicht (Fig. 6 a). Lediglich die intravasale NO-Freisetzung fällt bei der höchsten verwendeten Dosis ( $10 \mu\text{mol/l AETU } 0.237 \pm 0.014 \mu\text{mol} \times (1 \times 3\text{min})^{-1}$ ) deutlich geringer aus als bei den niedrigeren Dosen 1 bzw. 5  $\mu\text{mol/l AETU}$  ( $0.335 \pm 0.03 \mu\text{mol} \times (1 \times 3\text{min})^{-1}$  bzw.  $0.34 \pm 0.06 \mu\text{mol} \times (1 \times 3 \text{min})^{-1}$ ).

Die pulmonalarterielle Druckkurve verläuft wie bei HlyA-Stimulation ohne AETU. Der Maximalwert wird nach 12 - 14 Minuten erreicht und fällt dann deutlich ab (AETU 1  $\mu\text{mol/l } 15.0 \pm 5.2 \text{ mm Hg}$ ).

Eine Zugabe von AETU 5 Minuten vor LPS-Zumischung bewirkt eine vollständige Aufhebung der LPS-induzierten Reduktion der exhalativen und intravasalen NO-Freisetzung nach HlyA-Stimulus.

Die verwendeten Dosen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Der größte Effekt bezüglich der exhalativen Freisetzung ist bei einer Dosis von 5  $\mu\text{mol/l AETU}$  zu verzeichnen ( $57,5 \text{ ppb} \pm 3,8 \text{ ppb}$ ) (Fig. 7 a). Der höchste relative Anstieg der intravasalen Freisetzung zeigt sich bei der kleinsten verwendeten Dosis von 1  $\mu\text{mol/l AETU}$  ( $0.345 \pm 0.06 \mu\text{mol} \times (1 \times 3\text{min})^{-1}$ ). Die Werte für die übrigen Dosierungen liegen jeweils nur minimal niedriger (Fig. 7c).

Um diesen Effekt der iNOS-Hemmung weiter zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die AETU-Zugabe erst 160 Minuten nach Zumischung des LPS erfolgte (Kurzzeithemmung). Hier bewirkte das AETU jedoch keine Wiederherstellung der abgeschwächten NO-Freisetzung, wie es in den Versuchen mit Langzeithemmung zu beobachten war. Der Anstieg der exhalativen NO-Freisetzung betrug 2 Minuten nach HlyA-Stimulation bei LPS-Priming und Kurzzeithemmung im Mittel  $40,8 \text{ ppb}$  gegenüber  $57,5 \text{ ppb}$  bei Langzeithemmung der iNOS ( $p < 0,05$  für den Vergleich) (Fig. 8 a und b).

Die pulmonalarterielle Druckantwort unterscheidet sich jedoch nicht, da beide Versuchsreihen unter Zugabe von BM 13.505 durchgeführt wurden.

#### **4.5. Einfluß von Serum (Kaninchenserum 1%)**

##### **Versuchsgruppe Ic**

Der Zusatz von 1 % Kaninchenserum zur Perfusionslösung hat keinen Einfluss auf die Versuchsergebnisse. Die Versuche HlyA + LPS + BM und Serum, sowie die Versuche HlyA + Serum unterscheiden sich nicht signifikant von den Versuchen ohne Serum. Die untersuchten Parameter pulmonalarterieller Druck, pulmonale Gewichtszunahme und NO-Freisetzung können daher in unseren Versuchen als von Blutserumbestandteilen unabhängig betrachtet werden. Auf Versuche mit AETU und Serum wurde daher verzichtet.

Fig. 1

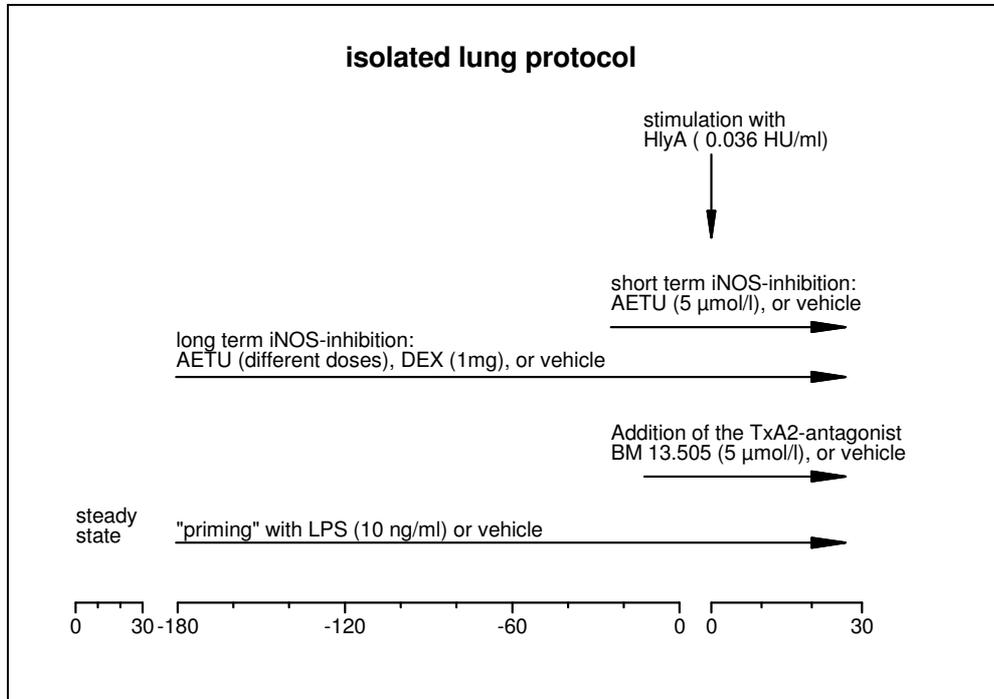
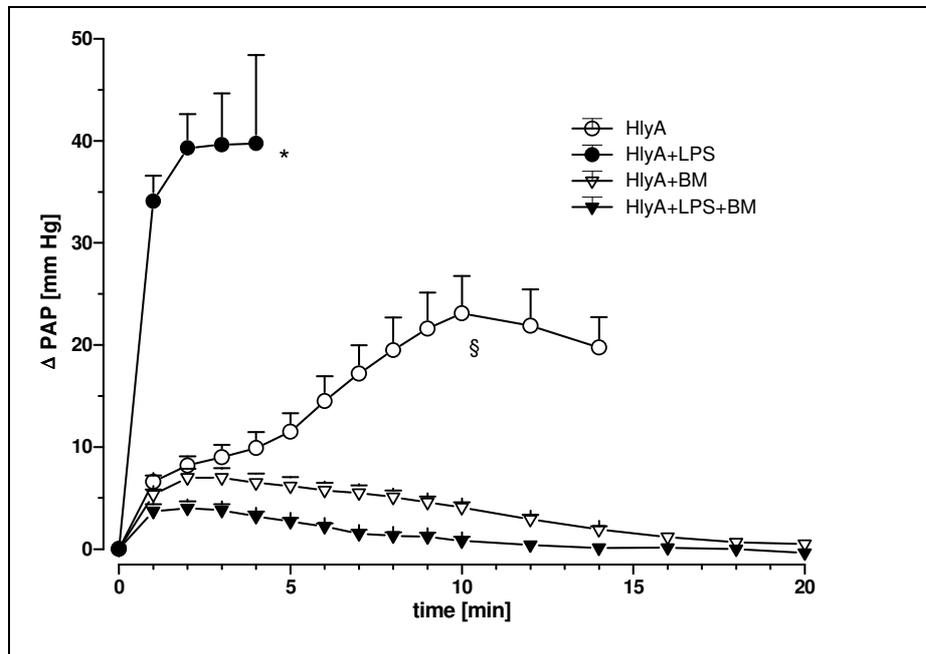


Fig. 1

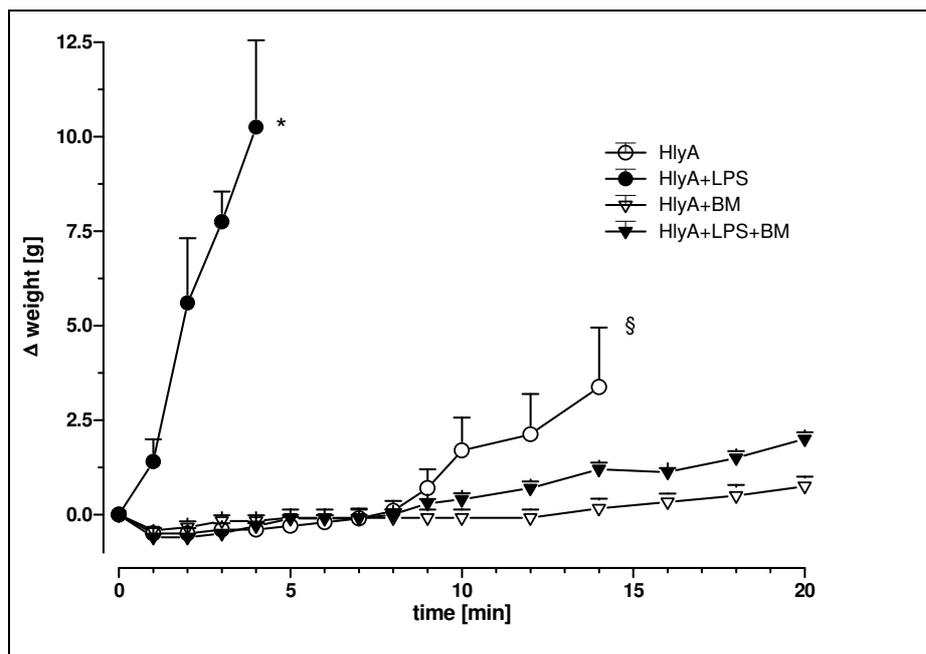
Darstellung des Versuchsprotokolls der isolierten Lunge. Die Wirkzeit der verschiedenen Agenzien ist durch horizontale, (Zumischung in die Perfusionslösung) oder vertikale Pfeile (Bolusinjektion in die Pulmonalarterie) dargestellt. Alle Protokolle zeigen einen dreigeteilten Ablauf (initiales „steady state“, „Priming“ in Anwesenheit oder Abwesenheit von LPS, Stimulation mit HlyA). Einzelheiten siehe Text.

Fig. 2 (Gruppe Ia und Ib)

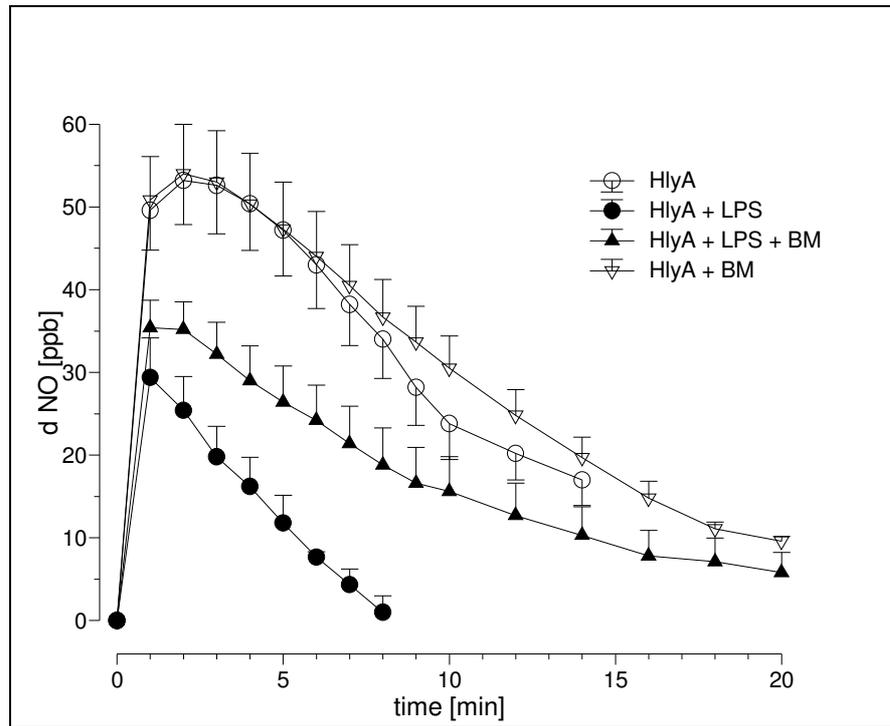
a)



b)



c) (Gruppe Ia und Ib)



d)

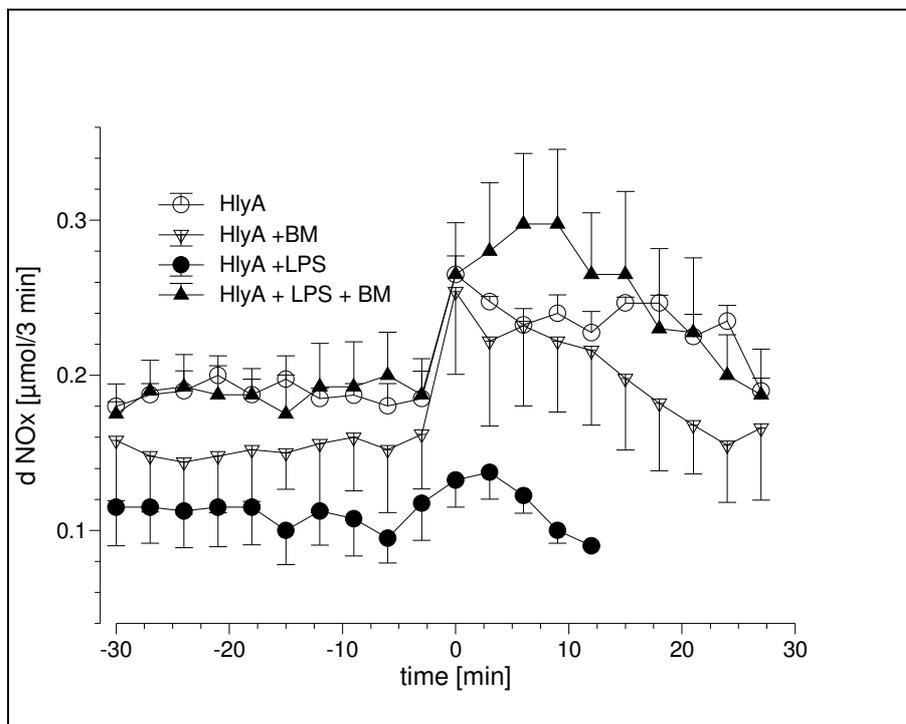


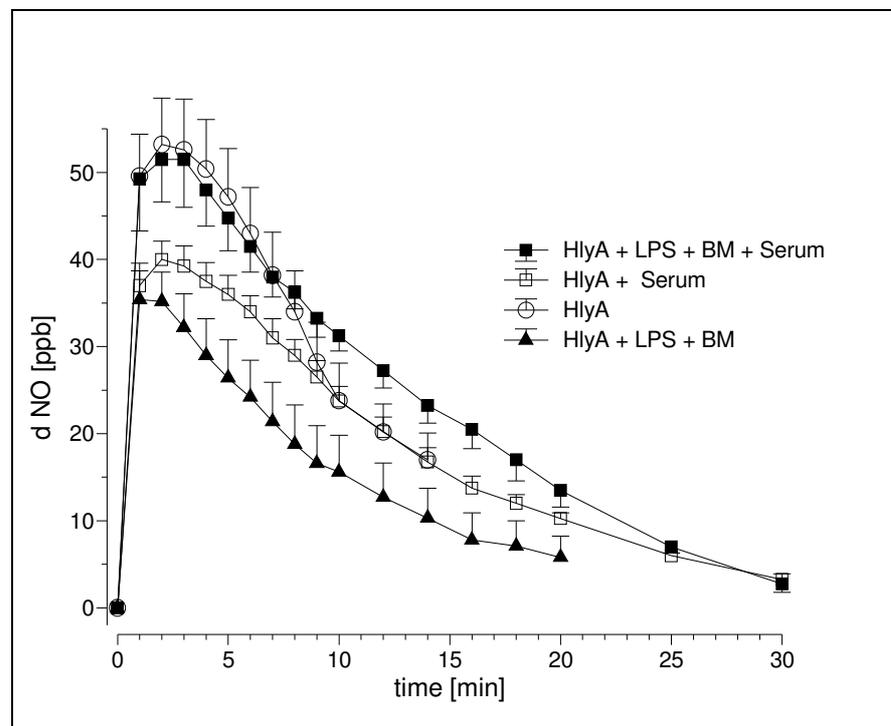
Fig. 2

Einfluß von LPS-Priming und dem TxA<sub>2</sub> Rezeptor-Antagonisten BM 13.505 auf den zeitlichen Verlauf des HlyA-induzierten pulmonalarteriellen Druckanstieg ( $\Delta$  PAP), Zunahme des Lungengewichtes ( $\Delta$  weight), exhalative ( $\Delta$  NO), and intravasale NO-Freisetzung ( $\Delta$  NO<sub>x</sub>).

Nach 180-minütigem Vorlauf (Kontrollbedingungen) erfolgt die Stimulation der Lungen mit HlyA bei Abwesenheit (HlyA, Gruppe Ia) oder Anwesenheit von BM 13.505 (HlyA + BM; Gruppe Ic). Ebenso erfolgt die Stimulation der Lungen nach regulärem LPS-Priming mit HlyA (HlyA + LPS; Gruppe Ib) oder HlyA plus BM 13.505 (HlyA + LPS + BM; Gruppe Id). Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils 5 unabhängigen Experimenten (bei nicht angezeigtem SEM sind diese Teil des Symbols).

Fig.3 (Gruppe I c)

a)



b)

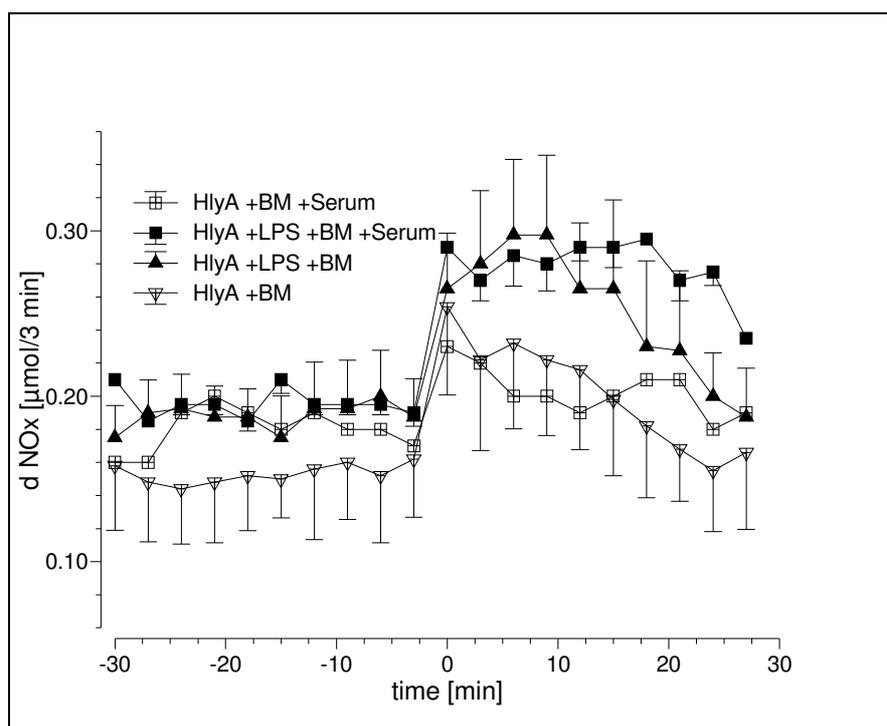
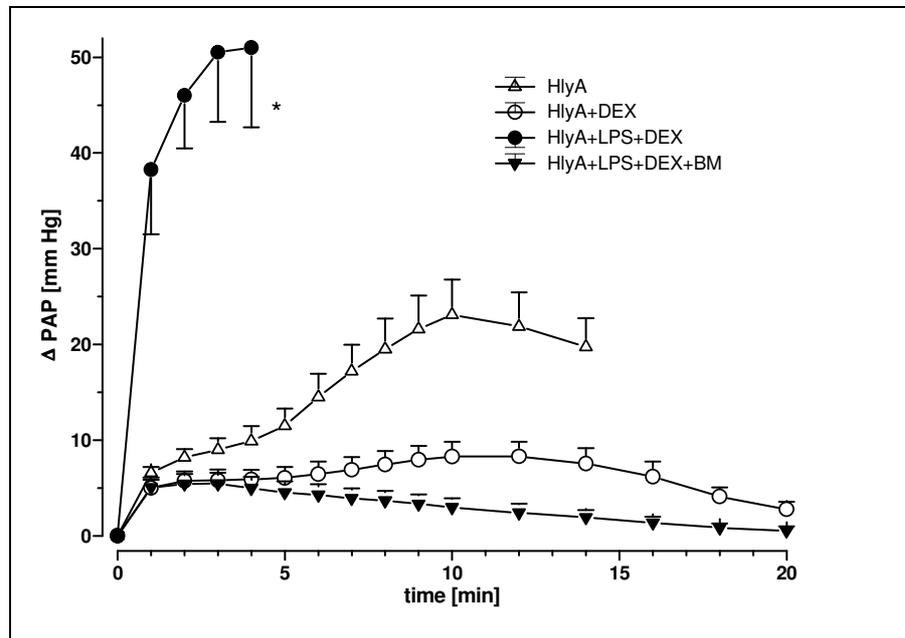


Fig. 3

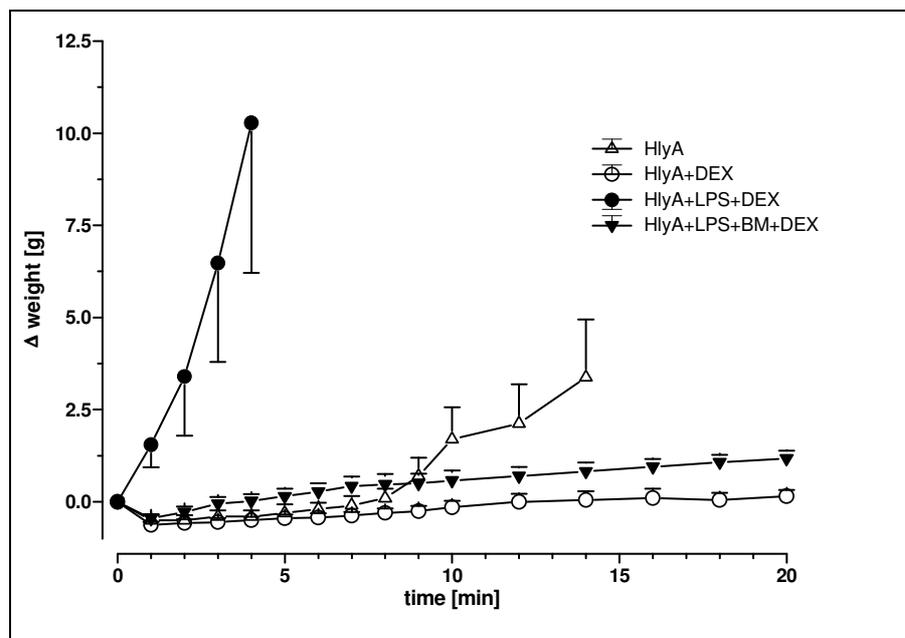
Versuche unter Zusatz von 1% Kaninchenserum in der Perfusatlösung zeigen keine signifikanten Unterschiede zu Versuchen ohne Serum. Dies lässt sich insbesondere für die intravasale NO-Freisetzung zeigen (Abb b). Auf Versuche von AETU mit Serum wurde daher verzichtet.

Fig. 4 (Gruppe I d)

a)



b)



c) (Gruppe Id)

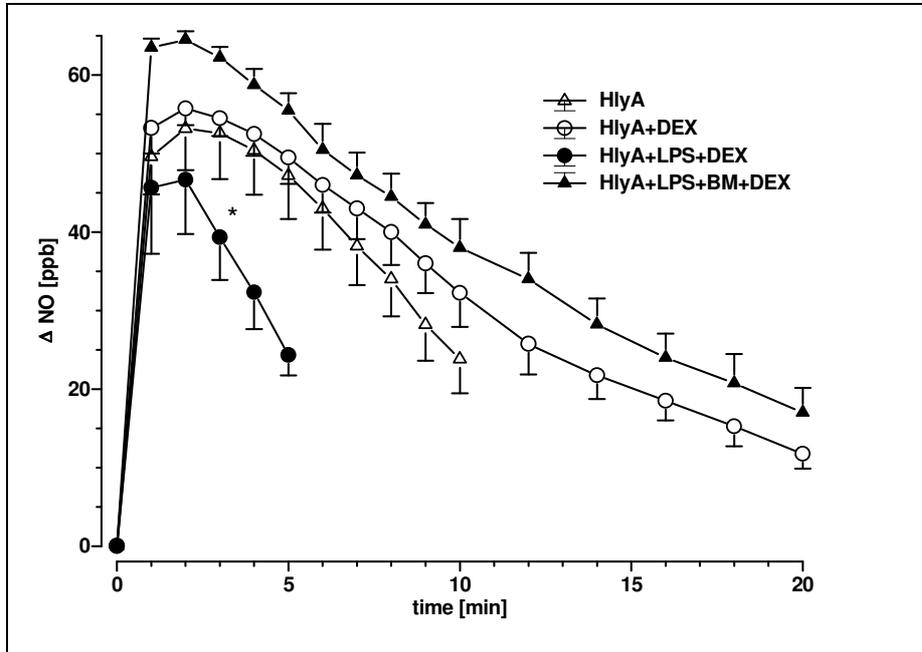


Fig. 4

Einfluss von LPS-Priming und dem Glucokortikoid Dexamethason auf den zeitlichen Verlauf des HlyA-induzierten pulmonalarteriellen Druckanstieges ( $\Delta$  PAP), Zunahme des Lungengewichtes ( $\Delta$  weight), und exhalative NO-Bildung ( $\Delta$  NO). Die Lungenperfusion erfolgt mit 10 ng/ml LPS und 1 mg Dexamethason oder Trägerlösung für 180 Minuten. Darauf folgt die Injektion von HlyA in die Pulmonalarterie zum Zeitpunkt „0“. BM 13.505 (5  $\mu$ mol/l) wird 20 Minuten vor HlyA-Stimulation zugegeben. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils 4 - 5 unabhängigen Experimenten (bei nicht angezeigten SEM sind diese Teil des Symbols). Die Experimente der HlyA+LPS+DEX-Gruppe werden wegen ausgeprägter Ödembildung vorzeitig beendet.

Fig. 5

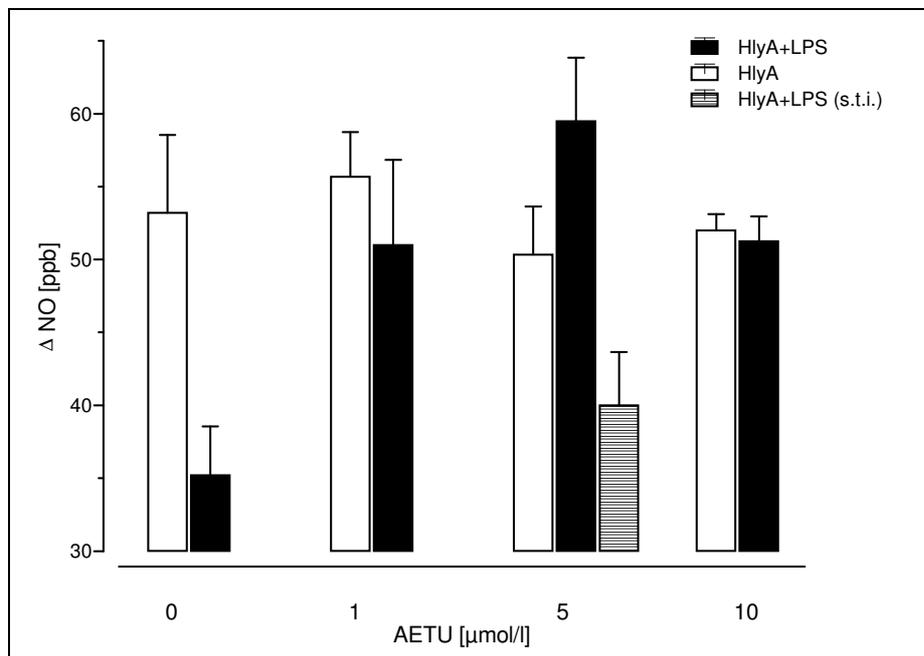


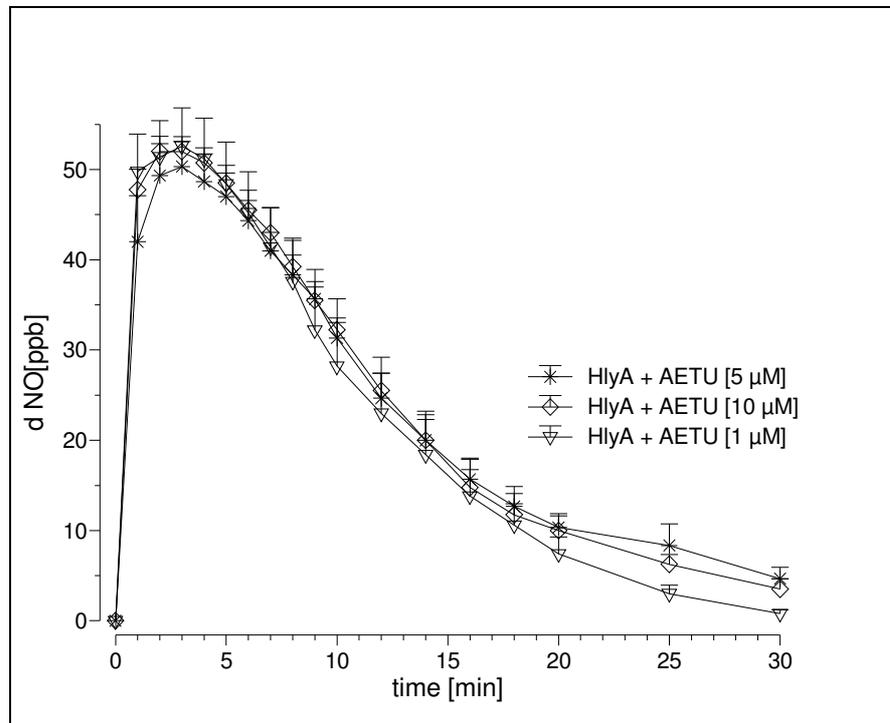
Fig. 5

Aufhebung der LPS-induzierten Hemmung der exhalativen NO-Bildung auf eine konsekutive Stimulation mit HlyA. Die Stimulation der Lungen erfolgt nach einer 3-stündigen Priming-Phase mit LPS (10 ng/ml) oder Trägerlösung. Der iNOS Inhibitor 2-(2-Aminoethyl)-2-thiopseudourea-dihydrobromid (AETU) wird dem Perfusat in verschiedenen Dosen 5 Minuten vor Gabe von LPS oder Trägerlösung zugemischt. In einer Untergruppe wird das AETU erst 160 Minuten nach LPS und 20 Minuten vor HlyA-Stimulation dem rezirkulierenden Perfusat zugemischt (short term inhibition, s.t.i.). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4-5 jeweils unabhängige Experimente.

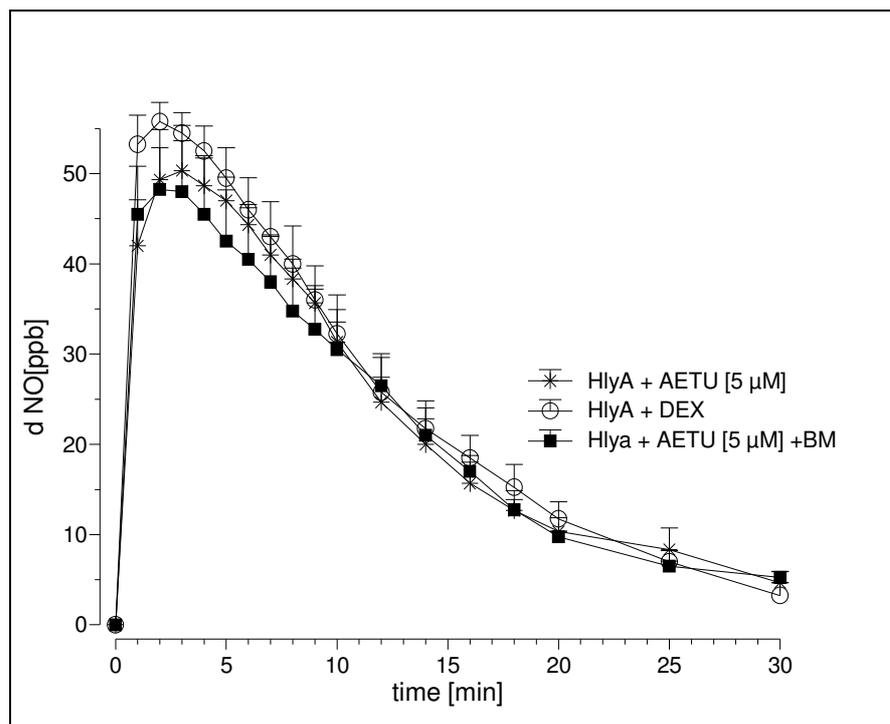
Die Wiederherstellung der exhalativen NO-Freisetzung zeigte sich nur bei AETU-Gabe vor LPS. Sie zeigte sich nicht bei den Experimenten mit späterer Zumischung (short term inhibition).

Fig. 6

a)



b)



c)

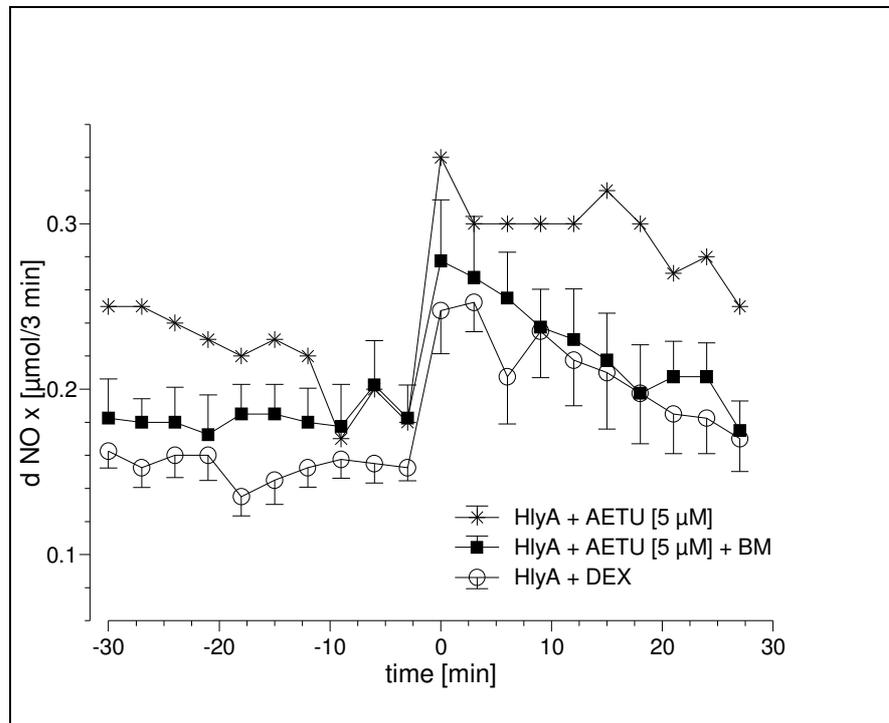
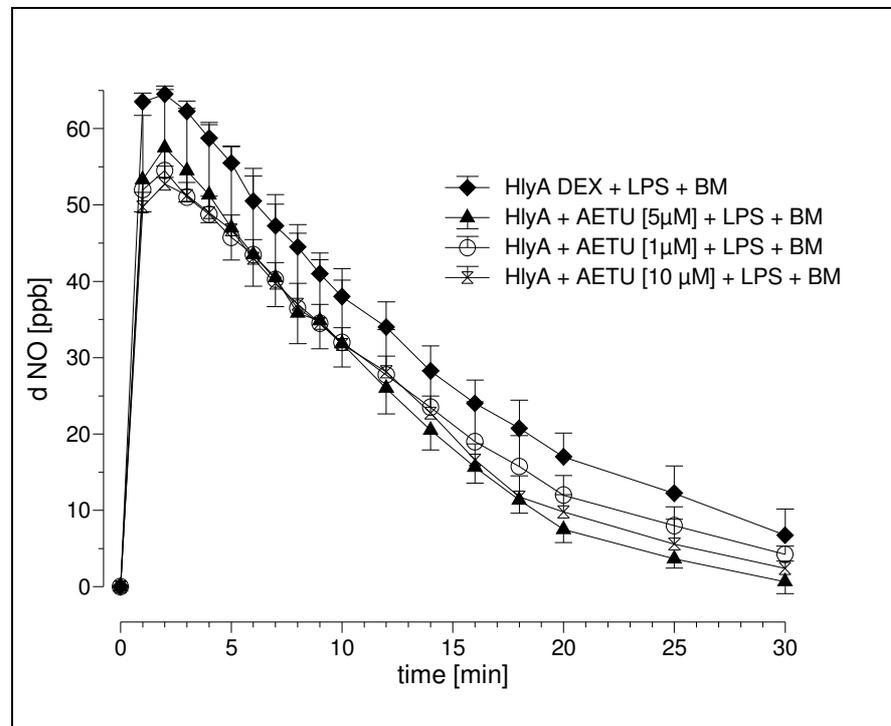


Fig. 6 (Versuchsgruppe IIa)

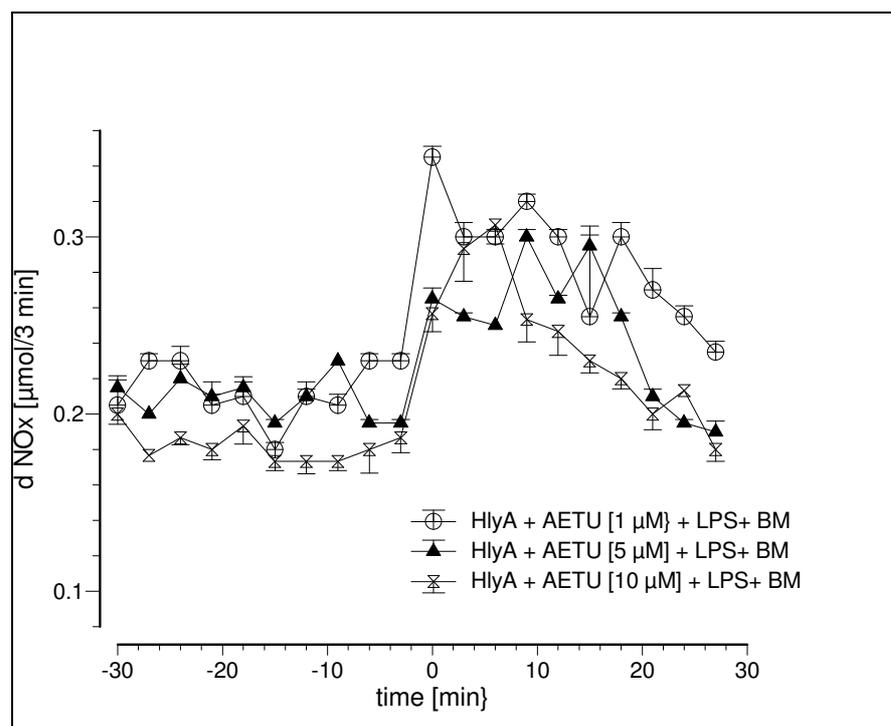
Die exhalative NO-Freisetzung auf HlyA zeigt bezüglich des AETU keine Dosisabhängigkeit. Die intravasale NO-Freisetzung ist bei der höchsten Dosis (10 µM) deutlich herabgesetzt. Der PAP-Anstieg zeigt einen ähnlichen Verlauf mit einem Maximalwert nach 12 bzw. 14 Minuten. Die Versuche unter Zumischung des Thromboxan-Antagonisten BM zeigen auch hier die typische Reaktion mit einem Maximalwert um  $\Delta 5$  mm Hg nach 2 - 3 Minuten. Die Versuche AETU 5µM + BM mit/ohne LPS zeigen dabei keinen signifikanten Unterschied. Die Versuche mit Dexamethason (1 mg) verlaufen bezüglich PAP, NO-exhalativ und NO-intravasal wie die Versuche AETU (5 µM) mit/ohne BM. Unter DEX zeigt sich exhalativ eine etwas gesteigerte NO-Freisetzung, intravasal findet sich dagegen ein etwas geringerer NO-Anstieg unter DEX.

Fig. 7 (Versuchsgruppe IIb)

a)



b)



c)

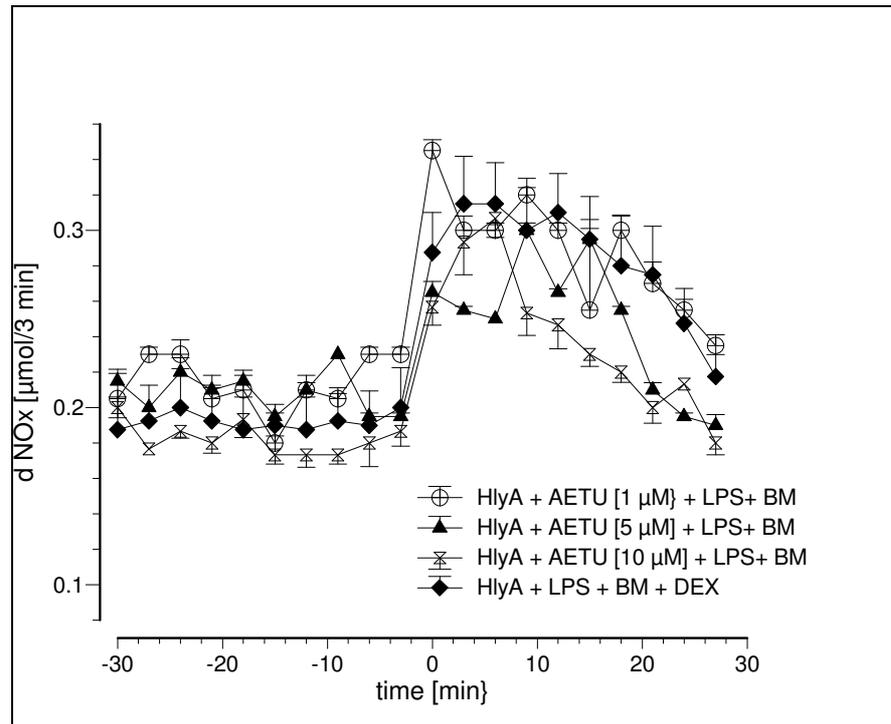
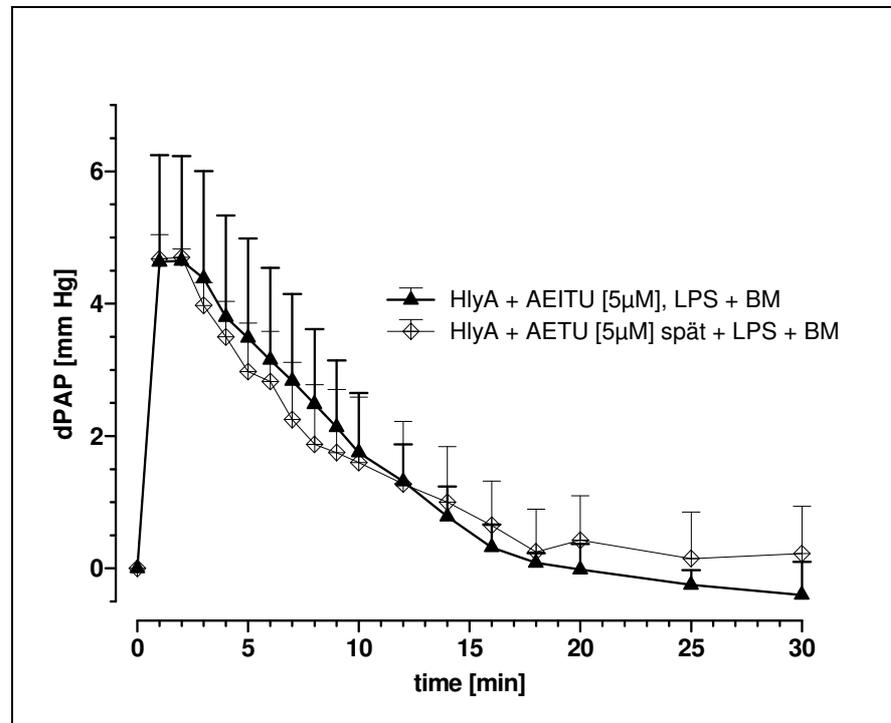


Fig. 7

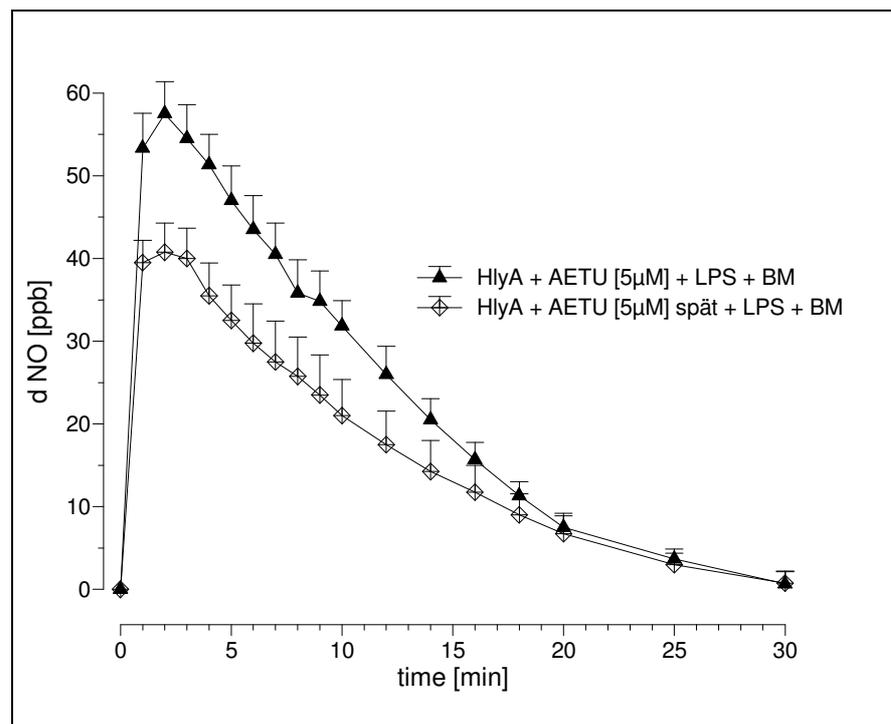
Nach LPS-Priming erfolgt die Stimulation mit HlyA bei Anwesenheit von AETU (1, 5 od. 10  $\mu\text{M}$ ) und BM (5  $\mu\text{mol/l}$ ) bzw. Dexamethason (1 mg) und BM. Die Versuche zeigen keine *signifikanten* Unterschiede. Der stärkste intravasale NO Anstieg auf HlyA nach LPS Vorbehandlung zeigt sich bei 1 $\mu\text{M}$  AETU. Den stärksten exhalativen Anstieg verzeichnen die Versuche HlyA + LPS + BM + DEX. Die PAP Reaktion zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede und erreicht in allen Versuchen ein Maximum nach 2 Minuten.

Fig. 8 (Versuchsgruppe III)

a)



b)



c)

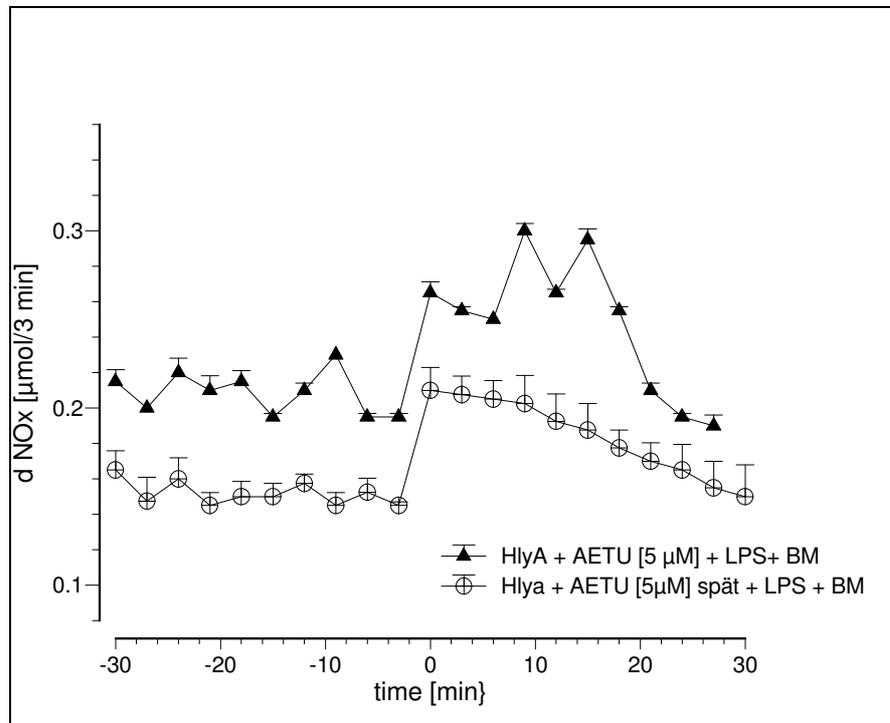


Fig. 8

Kurzfristige Hemmung der iNOS durch Zugabe von AETU (5  $\mu\text{M}$ ) am Ende der „Priming“ Phase, 20 Minuten vor HlyA Stimulation. Die exhalative NO Freisetzung ist bei später AETU Zugabe d. h. bei kurzfristiger iNOS Hemmung nach HlyA Stimulation unter LPS Vorbehandlung signifikant vermindert.

Die intravasale NO Freisetzung ist ebenfalls vermindert, jedoch ist das Ergebnis nicht signifikant. Im Abstieg des PAP unterscheiden sich beide Versuchsgruppen nicht.

## 5. Diskussion

### 5.1. Mechanismen der Vasodilatation und Vasokonstriktion beim ARDS

Im Rahmen eines ARDS bzw. eines septischen Geschehens kommt es auf der einen Seite zu einem Verlust der vasodilatatorischen Kapazität und auf der anderen Seite zu einem Anstieg der vasokonstriktorischen Potenz der Lunge mit der Folge einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP). Dieser Druckanstieg geht mit einer messbar erhöhten Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub> einher (SEEGER et al., 1989), was der Induktion der Cyclooxygenase II zugeschrieben werden kann (SWIERKOSZ et al., 1995).

Durch eine parenterale Gabe von LPS lässt sich der pathophysiologische Ablauf eines ARDS oder Sepsis in verschiedenen Tiermodellen gut reproduzieren (BRIGHAM und MEYRICK 1986).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass es nach 180-minütiger Vorbehandlung („Priming“) mit 10 ng/ml LPS zu einem Verlust der vasodilatatorischen Regulationsfähigkeit auf einen zweiten konstriktorischen Stimulus (*E. coli*-Hämolysin, HlyA) kommt.

In Versuchen ohne LPS zeigt sich auf Stimulation mit dem bakteriellen Exotoxin *E. coli*-Hämolysin (HlyA) ein moderater, kurzzeitiger PAP-Anstieg. Als dilatatorische Gegenregulation erfolgt eine prompte intravasale und exhalative NO-Freisetzung. Der Anstieg der exhalativen NO-Freisetzung erreicht ihren Höhepunkt nach 2-3 Minuten und fällt dann langsam auf das Ausgangsniveau zurück.

Diese akute NO-Freisetzung wird durch die Stimulation der konstitutiven NOS (cNOS) hervorgerufen (SCHÜTTE et al., 1998). Endothelzellen, Epithelzellen, Alveolarmakrophagen sowie Zellen des bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) können als mögliche Ursprungsorte der NO-Bildung gelten (SHAUL et al., 1994; XUE et al., 1996).

Die Aktivierung der cNOS erfolgt über einen Rezeptor-vermittelten Stimulus in diesen Zellen. Dies führt über G-Proteine zu einem Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>, bzw. zur Inositolphosphat-Bildung und damit zur Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulin-abhängigen Enzyms.

Dieser *second-messenger* Weg wird auch durch HlyA ausgelöst und bedingt damit die cNOS Aktivierung. Eine Stimulation der cNOS kann auch durch Ionophore wie das experimentelle Agens A23.187 erfolgen. Dies führt zu einem Überbrücken der G-Proteinrezeptor- vermittelten Antwort. NO gelangt zu glatten Muskelzellen, wo es über Guanylatcyclase-Aktivierung zu einer gesteigerten cGMP-Bildung führt. cGMP aktiviert in der Folge abhängige Proteinkinasen und führt zu einer Erschlaffung der glatten Muskelzelle.

Ausdruck der basalen, unstimulierten NO-Syntheserate der cNOS ist der physiologisch niedrige Gefäßtonus der Lungenstrombahn (MONCADA et al., 1991, ZAPOL et al., 1994, STAMLER et al., 1994).

Die Vorbehandlung mit LPS, unter der es zu einer Stimulation und Expression der iNOS kommt (LIU et al., 1993, GRIFFITHS et al., 1995, LASZLO et al., 1995), führt zu einer deutlich veränderten Gefäßreaktion auf einen folgenden Exotoxin-Stimulus. Nach HlyA-Gabe zeigt sich eine nochmals gesteigerte Tx-Bildung mit konsekutivem, exorbitantem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes, einer Ödembildung und parallel dazu einem Abfall der exhalativen und intravasalen NO-Freisetzung.

Diese Experimente finden ein frühes Ende mit Überschreiten der ödembedingten Gewichtsgrenze von 12 Gramm. Dies macht die Beurteilung der NO-Messung schwierig, da ein interstitielles Ödem die exhalative NO-Freisetzung um bis zu 75% zu reduzieren vermag (CREMONA et al., 1995). Aus diesem Grund erfolgte die Applikation des Tx-Rezeptor-antagonisten BM 13.505, um den HlyA-verursachten arteriellen Druckanstieg zu hemmen. BM 13.505 selbst übt keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung oder den basalen Gefäßtonus aus (SCHÜTTE et al., 1998).

Nach Zugabe des Tx-Antagonisten (BM) wird in LPS-vorbehandelten Gruppen nun ein Abfall der NO-Bildung nach einem HlyA-Stimulus deutlich. Der exhalative NO-Anstieg zeigt sich im Vergleich mit den Versuchen ohne LPS signifikant vermindert.

Bemerkenswerterweise zeigen die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Daten keine signifikante Änderung des pulmonalarteriellen Druckes bzw. signifikante Ödembildung der isolierten Kaninchenlunge während des „Priming“ mit LPS. Auch ein Anstieg der exhalativen oder intravasalen NO-Freisetzung ist erstaunlicherweise nicht festzustellen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorliegenden Arbeiten zu perfundierten Ratten (FEUERSTEIN et al., 1981), Ziegen (WINN et al. 1988) und Kaninchenlungen (WALMRATH et al., 1994). Im Widerspruch dazu stehen die Arbeiten von WANG et al. (1999) und FISCHER et al. (1999), die eine bis zu achtfach gesteigerte NO-Exhalation bei Rattenlungen nach LPS-Zugabe feststellten. Die Untersuchungen erfolgten allerdings entweder am Ganztiermodell, oder unter Verwendung einer blutenthaltenden Perfusionslösung.

Die Wirkung des Endotoxins erfolgt über die Bindung an den CD14-Rezeptor des plasmatischen LPS-bindenden Proteins (LBP). Über den transmembranen Rezeptor *toll-like-receptor* TLR2/TLR4 immunkompetenter Zellen erfolgt am zytosolischen Ende die Aktivierung von Enzymkaskaden (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)) sowie des NF- $\kappa$ B-Weges, der in eine Genexpression verschiedener inflammatorischer Mediatoren mündet (ZHANG et al., 2000, GUHA et al., 2001) und Zellen für einen nachgeordneten Stimulus empfänglich macht.

In den blutfreien, puffer-perfundierten Kaninchenlungen unserer Versuche finden sich weder LBP noch andere Endotoxin-sensitive humorale Mediatorsysteme wie die Gerinnungskaskade oder das Komplementsystem. Dies mag der Grund dafür sein, dass im Vergleich zum Ganztiermodell durch LPS allein nur geringe Effekte auf den pulmonalarteriellen Druck und die pulmonale Ödembildung zu verzeichnen sind. Ob aus diesem Grund in unseren Versuchen während des „Priming“ kein NO-Anstieg messbar ist, bleibt spekulativ. Jedenfalls zeigt eine jüngere Arbeit, dass die Expression der iNOS nach LPS unabhängig von Plasmakomponenten erfolgt (ERMERT et al. 2002). Die im vorliegenden Modell unter experimentellen Bedingungen festzustellende, LPS-induzierte TNF- $\alpha$  Bildung (WALMRATH et al., 1994) kann jedenfalls auch LBP-CD14-unabhängig vermittelt sein .

In unseren Versuchen unter Zusatz von 1 % Kaninchenserum konnten wir bezüglich Druckreaktion, sowie intravasaler und exhalativer NO-Freisetzung keine signifikanten Unterschiede zu den Versuchen ohne Serum feststellen.

Die wichtigste Erkenntnis der vorliegenden Experimente ist die unterschiedliche Regulation der Vasokonstriktion und Vasodilatation im Modell der isolierten Kaninchenlunge. Endotoxin führt zu einer gesteigerten TxA<sub>2</sub>-Bildung auf einen zweiten

inflammatorischen Stimulus, wohingegen es die antagonistische Exotoxin-bedingte NO-Bildung abschwächt.

Wir vermuten einen negativen Feedback-Mechanismus zwischen iNOS und cNOS, bzw. zwischen von iNOS gebildetem NO und cNOS.

Als Ursache könnte eine für Makrophagen beschriebene Hemmung der LPS-induzierten NO-Freisetzung durch NO-Donatoren (ASSREUY et al., 1993), bzw. eine verminderte NOS-Aktivität durch NO-Donatoren an bovinen Pulmonalarterien (BUGA et al., 1993) in Frage kommen.

### 5.2. Signaltransduktion

Der Abfall der NO-Synthese nach HlyA-Stimulation unter LPS-Vorbehandlung, und damit bedingt ein Abfall der vasodilatativen Kapazität (selbst bei Anwesenheit von BM), wird möglicherweise durch einen auf mehrere Stufen der Signalkette wirkenden Endotoxineffekt ausgelöst.

Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls zeigen, dass nach einer LPS-Vorbehandlung Rezeptor-vermittelte Stimuli nur eine verminderte NO-Synthese (MYERS et al., 1992, XIE et al., 1993) und Gefäßerschaffung in isolierten Koronararterien endotoxinvorbehandelter Ratten (PARKER und ADAMS, 1993), Femoral-, Renal- und Mesenterial-Arterien von Hunden (WYLAM et al., 1990) sowie Pulmonalarterien (SPATH et al., 1994) hervorrufen können. Als Ausdruck der verminderten dilatatorischen Kapazität zeigt sich nach LPS die pulmonale Vasokonstriktion auf Acetylcholin und Bradykinin in Rattenlungen deutlich gesteigert (FISCHER et al., 1999).

Widersprüchliche Untersuchungen liegen zur Ionophor A23.187-vermittelten Reaktionsantwort vor, die sich entweder ebenfalls gestört (FULLERTON et al., 1995), oder unbeeinflusst zeigt (PARKER et al., 1991). Fullerton et al. zeigten eine verminderte cGMP-Bildung in glatten Muskelzellen durch sowohl Endothel-abhängige wie –

unabhängige Agenzien, die durch cGMP-Analoga reversibel war. Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die eine ungestörte, (cGMP-vermittelte), Vasorelaxation auf Nitroprussid zeigen (PARKER et al., 1991). Eine andere Gruppe beschreibt in einem

Modell der septischen Ratte einen gesteigerten Umsatz von L-Arginin in der isolierten Lunge, jedoch ein vermindertes cGMP-Signal (KURREK et al., 1995).

Andere Untersuchungen berichten über eine differenzierte Regulation der mRNA beider NO-Synthasen für ein „in vivo Modell“ der septischen Ratte: Liu und Mitarbeiter fanden eine gesteigerte iNOS- und verminderte cNOS-mRNA Transkription unter septischen Bedingungen (LIU et al., 1996, MacNAUL et al., 1993). Der Ansatzpunkt für die Störung der Signalübertragung ist somit im Inneren der Endothelzelle bzw. der benachbarten glatten Muskelzelle zu suchen.

### 5.3. Pathophysiologische Veränderungen beim ARDS

Die vaskulären Veränderungen bei einem entzündlichen Geschehen wie ARDS führen zu einer globalen Funktionseinschränkung der Lunge. Einhergehend mit pulmonalem Hochdruck und einer gesteigerten Kapillarpermeabilität besteht eine lokale Dysregulation mit Shuntfluß und Totraumventilation.

Dem gegenüber steht der physiologische Mechanismus der koordinierten Anpassung von Ventilation und Perfusion zum Zwecke einer optimalen Oxygenierung. Dieser Mechanismus wird mit dem Begriff der hypoxischen Vasokonstriktion (HPV) beschrieben.

Ein Ungleichgewicht im Verhältnis zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Agonisten zugunsten Thromboxan-vermittelter pulmonaler Hypertension in den großen Widerstandsgefäßen wird von einer lokalen Störung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses ( $V/Q_a$ -mismatch) begleitet (WALMRATH et al., 1994). Eine Blockierung der NO-Bildung, die als Antwort auf einen exogenen Stimulus auftritt, senkt die Endothel-abhängige Vasodilatation und verstärkt den pulmonalen Druckanstieg.

Der typische Druckanstieg der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (WEISSMANN et al., 1995) oder der durch den TxA<sub>2</sub>-Agonisten U 46.619 und Angiotensin II hervorgerufene pulmonalarterielle Druckanstieg wird durch unselektive NOS-Inhibitoren noch verstärkt (GRIMMINGER et al., 1995). Diese Ergebnisse werden

durch jüngere Arbeiten an Rattenlungen bestätigt (FISCHER et al. 1999). In dieser Arbeit zeigt sich die HPV durch einen selektiven iNOS-Inhibitor nicht beeinflusst, ein unselektiver NOS-Inhibitor dagegen verstärkt den Mechanismus der hypoxischen Vasokonstriktion. Diese Versuche unterstreichen die Bedeutung der cNOS für die physiologischen Mechanismen der Gefäßregulation in der Lunge.

Nicht nur eine gesteigerte Bildung von TxA<sub>2</sub>, sondern auch die reduzierte Bildung von NO trägt damit zum verstärkten pulmonalarteriellen Druck bei, der nach sequenzieller Gabe von Endo- und Exotoxin in die isolierte Kaninchenlunge auftritt. Eine Störung der Balance von Vasokonstriktion und Vasodilatation führt zu einer Ventilations-Perfusionsstörung, wodurch zum pulmonalen Hochdruck eines Entzündungsgeschehens noch ein gestörter Gasaustausch hinzu kommt.

### **5.4. Selektive Hemmung der iNOS: Eine neue therapeutische Strategie?**

Mit dem Nachweis der NO-Isoformen (cNOS, nNOS und iNOS) entstand der Wunsch nach einer selektiven Hemmung der enzymatischen Aktivität. Neben Untersuchungen zur Steuerung der physiologischen Vasomotorik durch Hemmung der cNOS ist insbesondere eine selektive Hemmung der für infektiöse und septische Zustände bedeutsamen iNOS von großem therapeutischen Interesse. Die in früheren Arbeiten verwendeten Inhibitoren wie N-methyl-L-arginin oder N-nitro-L-arginin zeigten diese Selektivität jedoch nicht. Mittlerweile stehen verschiedene Verbindungen mit hoher NOS-Isoformenselektivität für experimentelle Anwendungen zur Verfügung (SALERNO et al., 2002).

Um die Beobachtung, dass ein LPS-“Priming“ zu einer reduzierten exotoxin-verursachten NO-Bildung führt, weiter abzuklären, wurden Versuche mit Dexamethason und dem iNOS-Inhibitor 2-(2-Aminoethyl)-2-Thiopseudourea-Dibromid (AETU) durchgeführt. Bei AETU handelt es sich um einen selektiven Inhibitor der iNOS (SOUTHAN et al., 1995, TRACEY et al., 1995).

In unseren Versuchen führt eine Langzeit-Hemmung der iNOS nicht zu einer reduzierten basalen NO-Bildung. Auf Exotoxinstimulation erfolgen ein pulmonalarterieller

Druckanstieg sowie eine antagonisierende NO-Freisetzung wie in Versuchen ohne LPS. Daraus lässt sich ableiten, dass die selektive Hemmung der iNOS zu einer Wiederherstellung der dilatatorischen Kapazität führt.

Dexamethason, ein synthetisches Glukokortikoid mit starken, aber unspezifischen entzündungshemmenden Eigenschaften, übt bei Zumischung in das Perfusat 10 Minuten vor LPS-Gabe den gleichen Effekt auf die NO-Bildung aus.

Im Gegensatz hierzu konnte durch Zusatz des iNOS-Inhibitor AETU erst 160 Min. nach LPS-Applikation (20 min. vor HlyA-Applikation) die NO-Bildung nicht erhalten werden.

Dexamethason unterdrückt die Induktion der iNOS durch Hemmung der mRNA-Translokation und gesteigerte Degradation von iNOS-Protein (KUNZ et al., 1996). Es hat allerdings keinen Effekt auf die LPS-verursachte Unterdrückung von cNOS mRNA (LIU et al., 1996).

AETU, als spezifischer iNOS-Inhibitor, wirkt über eine direkte Enzymhemmung. Obwohl wir in unserem Lungenmodell keine direkte Enzymaktivitätsmessung durchführten, vermuten wir, dass sowohl eine gehemmte iNOS-Induktion als auch eine blockierte iNOS-Aktivität zur reduzierten NO-Bildung durch die iNOS beitragen. Wie bereits gezeigt werden konnte, besteht eine feedback-Hemmung der konstitutiven NOS durch NO selbst (RAVICHANDRAN et al., 1995). Eine interessante Arbeit von Cadogan (CADOGAN et al., 1999) konnte zeigen, dass eine chronische pulmonale Infektion von Rattenlungen mit *P. aeruginosa* zu einer erhöhten Expression von iNOS und zur verminderten Expression von cNOS führt, ohne dass jedoch eine gesteigerte NO-Freisetzung messbar wird.

Wir vermuten daher, dass von der iNOS gebildetes NO die cNOS hemmen kann, bzw. dass eine iNOS-Expression einen negativen feedback-Mechanismus auf die cNOS ausübt. Dies wird auch durch verschiedene jüngere Arbeiten an einem Modell einer septischen Rattenlunge bestätigt (SCOTT et al., 2002, ERMERT et al., 2002).

Welche Rolle ein solcher Mechanismus bei der differenzierten Regulation der cNOS durch die iNOS in einem entzündlichen Geschehen spielt, bleibt spekulativ. Möglicherweise wirken auch weitere Mechanismen auf dieses Phänomen ein, wie eventuell eine Hemmung der cNOS durch Entzündungsmediatoren.

### 5.5. Ausblick: Therapieansätze am Menschen

Die Inhibition der NO-Bildung, bzw. der NOS wird schon lange als mögliche Strategie in der Therapie eines ARDS oder eines septischen Geschehens untersucht. Die dabei in früheren Jahren verwendeten unselektiven NOS-Inhibitoren zeigten jedoch fatale Ergebnisse im Tiermodell (ROBERTSON et al., 1994) sowie am Menschen (PETROS et al., 1994). Auch eine aktuelle klinische Studie mit dem unselektiven NOS-Inhibitor N-methyl-L-arginin-hydrochlorid zur Behandlung des septischen Schocks musste wegen gesteigerter Mortalität in der Behandlungsgruppe abgebrochen werden (WATSON et al., 2004).

Mit der Entwicklung neuer, hochselektiver iNOS-Inhibitoren wurden diese jedoch erneut als mögliches therapeutisches Werkzeug interessant. So zeigt eine Arbeit von WU et al. für die Verwendung selektiver iNOS-Inhibitoren ein verlängertes Überleben bei LPS-behandelten Ratten und Mäusen (WU et al., 1995). Die Funktion der iNOS kann jedoch als noch nicht vollständig aufgeklärt betrachtet werden. Versuche an genmanipulierten, iNOS-defizienten Mäusen zeigen kein einheitliches Bild. Die periphere Hypotension und Lungenschädigung nach Endotoxin-Injektion zeigt sich bei diesen Mäusen aufgehoben (MacMICKING et al., 1995); verschiedene Krankheitsbilder wie z. B. eine Riesenzellarteriitis verlaufen in deutlich schwächerer Ausprägung (GILKESON et al., 1997). Andererseits zeigen diese Mäuse eine pathologisch verstärkte Aktivierung, Sequestrierung und Akkumulation von Neutrophilen in einem septischen Geschehen (McCAFFERTY et al., 1997). Die aseptische Wundheilung verläuft bei iNOS-Defekt deutlich verzögert (YAMASAKI et al., 1998).

Die iNOS scheint daher nicht nur Effektor einer NO-Freisetzung zu sein, sondern im Rahmen eines septischen Geschehens auch als Regulator wirksam zu sein (NATHAN et al., 1997).

Als Alternative zum Einsatz von iNOS-Inhibitoren wäre die Verstärkung der NO-vermittelten Vasodilatation durch Hemmung des cGMP-abbauenden Enzyms vorstellbar.

Zur Aufrechterhaltung der cNOS vermittelten Vasodilatation zeigen aktuelle Arbeiten einen therapeutischen Einsatz von Phosphodiesteraseinhibitoren bei der chronisch-pulmonalen Hypertonie (GHOFRANI et al., 2002, MICHELAKIS et al., 2002).

Inhibitoren des Enzyms Phosphodiesterase-5 (PDE-5) hemmen den Abbau von cGMP und steigern damit eine durch NO ausgelöste Relaxation der glatten Muskelzelle. Zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (ED) sind bisher drei dieser Substanzen als Arzneimittel zugelassen.

Durch die Verwendung des PDE-5-Inhibitors Sildenafil konnte in einer randomisierten Studie an Patienten mit pulmonaler Hypertonie und Lungenfibrose eine pulmonale Vasodilatation und ein verbesserter Gasaustausch erreicht werden (GHOFrani et al., 2002).

Bei den Mechanismen der gestörten Gefäßregulation spielt NO eine entscheidende Rolle. Sowohl der Einsatz von NO-Inhibitoren als auch von NO-Donatoren als therapeutisches Agens kann bei verschiedenen klinischen Stadien und zu verschiedenen Zeiten eines septischen Geschehens von therapeutischem Nutzen sein. Ziel der Behandlung muss sein, die positiven, physiologischen Funktionen von NO zu erhalten und die negativen zu verhindern.

## 6. Zusammenfassung

Sepsis und schwere bakterielle Infektionen werden von der Freisetzung bakterieller Endo- und Exotoxine begleitet. Endotoxin (LPS) führt zur Expression einer induzierbaren NO-Synthase. Zu den Effekten von Endotoxin auf die konstitutive NOS (cNOS) hingegen liegen bisher erst wenige Untersuchungen vor. Das E. coli-Hämolysin (Hly) A, ein Exotoxin, führt zu einer starken Stimulation der cNOS, sowie zur Thromboxan (Tx)-Bildung und damit verbundenen Vasokonstriktion im Modell der isolierten Kaninchenlunge.

Wir untersuchten den Einfluss einer sequentiellen Gabe von LPS und HlyA auf die pulmonale NO-Freisetzung, und deren Auswirkung auf die Steuerung des pulmonalen Gefäßwiderstandes. Des Weiteren wurden der Einfluss von Dexamethason (DEX) sowie des spezifischen iNOS-Inhibitors 2-(2-Aminoethyl)-2-thiopseudourea-dihydrobromid (AETU) auf die durch LPS-verursachten Effekte erforscht.

Isolierte Kaninchenlungen wurden für 180 Minuten in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 ng/ml LPS perfundiert, dann erfolgte eine Injektion von HlyA in die Pulmonalarterie. Eine on-line-Messung des in das alveoläre und intravasale Kompartiment freigesetzten NO erfolgte über Chemilumineszenzdetektion des abgeatmeten NO, bzw. durch Messung von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> im Perfusat.

Die Applikation von DEX- oder AETU erfolgte vor Gabe von LPS (Langzeit iNOS-Hemmung) oder 20 Minuten vor dem HlyA-Stimulus (AETU, Kurzzeithemmung). Eine Stimulation mit HlyA führte in Lungen ohne LPS-Vorbehandlung zu einer pulmonalen Vasokonstriktion. Parallel dazu kam es zu einem Anstieg der intravasalen und exhalativen NO-Freisetzung.

Nach einer 180-minütigen Perfusion mit LPS fiel die HlyA-stimulierte, cNOS-vermittelte NO-Freisetzung deutlich geringer aus, während die Tx-Bildung und die konsekutive Vasokonstriktion deutlich verstärkt wurden.

Eine Langzeithemmung der iNOS mit AETU oder DEX führt zu einer unbeeinflussten, cNOS-vermittelten HlyA vermittelten NO-Freisetzung in mit LPS-behandelten Lungen. Eine Kurzzeithemmung der iNOS nach LPS-Stimulation verhinderte nicht die Reduktion der cNOS-vermittelten durch HlyA ausgelösten NO-Freisetzung.

Wir vermuten daher einen hemmenden Effekt der durch LPS induzierten iNOS auf die cNOS-vermittelte Vasodilatation, der neben Anstieg der Tx-Bildung, zu einem dramatisch gesteigerten pulmonalarteriellen Druck nach sequenzieller Gabe von Endo- und Exotoxin führte.

Eine Hemmung der iNOS durch einen spezifischen Inhibitor, oder die Suppression der iNOS-Induktion durch Dexamethason, führte zu einem Erhalt der cNOS-abhängigen NO-Freisetzung unter LPS-Vorbehandlung.

Diesen Mechanismen könnte in der Pathogenese des septischen Lungenversagens eine wichtige Rolle zukommen.

## ***Abstract***

Severe bacterial infections and sepsis are accompanied by liberation of microbial endo- and exotoxins. Endotoxin (LPS) provokes expression of an inducible NO-synthase, whereas effects on isoforms of constitutive NOS (cNOS) are poorly characterized. The *E. coli*-hemolysin (Hly) A, an exotoxin, is a potent stimulus for the cNOS which causes thromboxane (Tx) generation and related vasoconstriction in perfused rabbit lungs.

We investigated the influence of sequential application of LPS and Hly A on pulmonary liberation of NO and their impact on regulation of pulmonary vascular resistance. In addition, the influence of dexamethasone (Dex) and of the specific iNOS-inhibitor 2-(2-Aminoethyl)-2-thiopseudourea-dihydrobromide (AETU) on LPS-induced effects were studied.

Isolated rabbit lungs were perfused for 180 min in absence or presence of 10 ng/ml LPS, followed by injection of HlyA. Release of NO into both alveolar and in intravascular compartment was on line-monitored by chemiluminescence detection of expired NO and by measurement of NO degradation products in the perfusate. Dex or AETU were applied prior to LPS administration (long-term iNOS inhibition) or 20 min prior to HlyA challenge (short-term inhibition).

HlyA-challenge of lungs without LPS-pretreatment induced an increased intravascular and exhalative NO-release in parallel to pulmonary vasoconstriction. After 180 min of perfusion with LPS, the HlyA-stimulated, cNOS-mediated liberation of NO was markedly reduced, whereas formation of Tx and consecutive pulmonary vasoconstriction were amplified.

Long-term iNOS inhibition with AETU or suppression of iNOS expression with Dex resulted in a unimpaired cNOS mediated NO-liberation in LPS-treated lungs whereas short-term iNOS-inhibition did not show this effect.

These data demonstrate that in addition to an increased Tx-formation, suppression of cNOS-mediated pulmonary vasodilation by LPS contributes to the dramatically amplified pulmonary arterial pressure response after sequential application of endotoxin and exotoxin.

Inhibition of iNOS with a specific inhibitor or suppression of iNOS induction results in an restored cNOS activity after LPS pretreatment. This mechanisms may be significant for the pathogenesis of septic lung failure.

## 7. Abkürzungen und Symbole

Ach Acetylcholin

ADP Adenosindiphosphat

AETU 2-(2-Aminoethyl)-2-Thiopseudourea-Dibromid

ARDS adult respiratory distress syndrome

BALT bronchusassociated lymphoid tissue

BM 13.505 Daltroban (4-(2-(4-Chlorbenzolsulfonylamino)-ethyl)-Phenylacetylsäure)

COX Cyclooxygenase

cGMP cyclisches Guanosinmonophosphat

DEX Dexamethason

*E.coli.* Escherichia coli

ED erektile Dysfunktion

EDRF endothelium-derived relaxing factor

FAD Flavin-Adenin-Dinucleotid

FMN Flavinmononucleotid

HlyA *E. coli* Hämolysin A

HPV hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

IL Interleukin

IFN Interferon

LBP Lipopolysaccharid-bindendes-Protein

LPS Lipopolysaccharid

LT Leukotrien

NO Stickstoffmonoxid

NO<sub>2</sub>. Nitrit

NO<sub>3</sub>. Nitrat

NO<sub>x</sub> zusammenfassend für oxidative Endprodukte des NO

MAP Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

M mol/l z.B. mM, μM

cNOS konstitutive NO-Synthase

iNOS induzierte NO-Synthase

PG Prostaglandin

PAF Plättchen aktivierender Faktor

PaO<sub>2</sub> Sauerstoffpartialdruck

PaCO<sub>2</sub> Kohlendioxidpartialdruck

PAP pulmonalarterieller Druck (*engl. Pressure*)

PCWP pulmonal capillary wedge pressure

PDE Phosphodiesterase

PEEP positiver endexpiratorischer Druck

PMN polymorphkernige Neutrophile

THB Tetrahydrobiopterin

TNF- $\alpha$  Tumornekrosefaktor

TxA<sub>2</sub> Thromboxan

## 8. Literaturverzeichnis

Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA et al. :Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000; 28:232-235

Amato MBP, Barbas CM, Medeiros DM, et al. Effect of a protective ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338:347-54

Arkovitz MS, Wispe JR, Garcia VF, Szabo C. Selective inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase prevents pulmonary transvascular flux during acute endotoxemia. *J Pediatr Surg* 1996 Aug; 31 (8): 1009-15.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967, Aug 12; 2(7511): 319-23

Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108, 833-837.

Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 411-415.

Beckman J, Beckman T, Chen J, et al: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite :Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990,1620-1624

Beckman J, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitride formation. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 330-334.

Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, et al. High -dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987; 317: 1565-1570.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al: The American-European consensus conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *AM J Respir Crit Care Med* 1994; 149:818-824

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

---

Beutler B, Poltorak A: The search for Lps: 1993- 1998. *J Endotoxin Research* 2000;4(6):269-293

Bigatello LM, Hurford RM, Kacmarek RM, Zapol WM: Prolonged inhalation of low concentrations of nitric oxide in patients with severe adult respiratory distress syndrome. Effects on pulmonary hemodynamics and oxygenation. *Anesthesiology* 80 (1994) 761-770

Bhakdi S, Walev I, Jonas D, Palmer M, Weller U, Suttorp N, Grimminger F, Seeger W. Pathogenesis of septic syndrome: possible relevance of pore-forming bacterial toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216:101-118.

Bhakdi S, Tranum-Jensen J.: Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1987;107:148-223.

Bhakdi, S., N. Mackman, J.-M. Nicaud, I.B. Holland.: Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* 1986; 52:63-69.

Blair E, Hickham JB: the effect of change in body position on lung volume and intrapulmonary gas mixing in normal subjects. *J Clin Invest* 1995; 34, 383-389.

Blough, N. V. und Zafiriou, O. C. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxy nitrite in alkaline aqueous solution. *Inorganic Chem.* 1985; 24, 3502.3504

Braman, R. S. and Hendrix, S. A. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium(III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* 1989; 61, 2715-2718

Brigham KL, Meyrick B: Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986 May; 133(5):913-27.

Brightbill HD, Modlin RL: Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* 2000; 101, 1-10

Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LJ: Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res*; 1993, 73, 808-812

Burnett AL: Role of nitric oxide in physiology of erection. *Biol.Reprod* 1995, 52, 485-489

Busse R, Pohl K, Luckhoff A: Mechanisms controlling the production of endothelial autacoids. *Z Kardiol* 1989; 78 Suppl. 6:64-9

Cadogan E, Hopkins N, Giles S, Bannigan JG, McLoughlin P: Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase without vasodilator effect in chronically infected lungs. *Am J Physiol* 1999;277 Sep.L 616-27.

Cavalieri S, Bohach GA, Snyder IS. Escherichia coli  $\alpha$ -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev* 1984; 1(48), 326-343.

Cox, RD. Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Anal. Chem.* 1980; 52, 332-335

Connelly K, Repine JE. Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. *Annu Rev Med* 1997; 48: 429-445.

Cremona G, Higgenbottom T, Takao M, Hall L, Bower EA: Exhaled nitric oxide in isolated pig lungs. *J Appl Physiol* 1995 Jan; 78 (1): 59-63

Cresser MC. Nitrate determination by reduction to ammonia and gas-phase ultraviolet absorption spectrometry. *Analyst* 1977;102, 99-103

Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 186, 1155-1159.

Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82, 1598-1610.

Dellinger RP, Taylor RW, Zimmerman JL, Straube RC. Inhaled nitric oxide in acute lung injury. *JAMA* 2004; 298:327

Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, Straube RC, Hauser DL, Criner GJ et al. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. Results of a randomized phase II trial. *Crit Care Med* 1998 Vol. 26, No. 1, 15-23.

Dennehy KC, Bigatello LM: Pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome. *Int Anesthesiol Clin* 1999;37(3):1-13

Donnelly TJ, Meade P, Jagels M, et al: Cytokine, complement and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome following injury. *Crit Care Med* 1994; 22:768-776

Dreyfuss DP, Soler G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and high positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137, 1159-1164.

Ermert M, Ruppert C, Günther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L: Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest* 2002 82: 425-441

Evans TE, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 41: 77-81

Fenton MJ, Golenbock DT: LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol.* 1998; 64:25-32

Feuerstein N, Ramwell PW. In vivo and in vitro effects of endotoxin on prostaglandin release from rat lung. *Br J Pharmacol* 1981 Jun;73(2): 511-6.

Fischer LG, Damian J, Horstman MS, Hahnenkamp K, Rich GF: Selective iNOS Inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in LPS-exposed rat lungs. *Anesthesiology* 1999; 91:1724-32

Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998;Dec; 26(12):2078-86

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al: Nitric oxide synthase isoforms: Characterization, purification, molecularcloning and functions. *Hypertension* 1994;23:1121-1131

Frostell C, Blomquist H, Hedenstierna G, et al. Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology* 1993; 78:427-435

Fullerton DA, McIntyre RC, Hahn AR, Agrafojo J, Banerjee A, Harken AH. Dysfunction of cGMP-mediated pulmonary vasorelaxation in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Physiol* 1995 Jun; 268: L1029-L1035.

Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376

Furchgott R. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium derived relaxing factor is nitric oxide. In: *Mechanism of Vasodilatation*, edited by P. Vanhoutte. New York: Raven, Vol. IV.

Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O. Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their Lipid A component. *Int Rev Biochem* 1977; 14, 239-335.

Galanos C, Freudenberg MA, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O. *Prog Clin Biol Res* 1979; 29, 320-332

Gallay P, Barras C, Tobias PS, Calandra T, Heumann D. Lipopolysaccharide (LPS) –binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS. *J Infect Dis* 1994; 170, 1319-1322.

Garvey EP, Oplinger GJ, Tanoury GJ, Sherman PA, Marshall MFS, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases, inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* 269:26669-26676;1994.

Gaston B, Drazen J, Loscalzo J. et al. State of the art: the biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:538-551

Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M. Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90, 522-526.

Gessler T. Kontinuierliche Messung von Stickstoffmonoxid, sowie dessen Oxidationsprodukten Nitrit, Nitrat und Peroxinitrit in zirkulierenden Flüssigkeiten mittels Amperometrie und

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

---

Chemilumineszenz. Wettenberg: VVB Laufersweiler Verlag 1997, 1. Auflage.

Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002 Sep 21;360(9337):895-900.

Gilkeson GS, Mudgett JS, Seldin MF, Ruiz P, Pisetsky DS, Weinberg JB. Clinical and serologic manifestations of autoimmune disease in MRL-*lpr/lpr* mice lacking nitric oxide synthase type 2. *J Exp Med* 1997; 186:365-373

Griffiths MJD, Liu S, Curzen NP, Messant M, Evans TW. In vivo treatment with lipopolysaccharide induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1995; 268: L509-L518

Grimminger F, Sibelius U. et al. Subhemolytic doses of *E. coli* hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils. *J Biol Chem* 1991; 266: 14262-14269

Grimminger, F., M. Thomas, R. Obernitz, D. Walmrath, S. Bhakdi, and W. Seeger: Inflammatory lipid mediator generation elicited by viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in lung vasculature. *J. Exp. Med.* 1990;169: 737-754.

Grimminger F, Spriestersbach R, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W. Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 1995; 1509-1515.

Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 2001;13, 85-94

Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS) –binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp. Med.* 1994; 179, 269-277.

Hart CM: Nitric oxide in adult lung disease. *Chest* 1999 May; 115(5): 1407-17

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52(2):269-79.

Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Goyert SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 1996; 4: 407-14.

Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 1998; 55(4):487-496.

Hibbs Jr JB, Westenfelder C, Taintor R. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992;89,867-877.

Hoffmann JA, Hetru C. Insect defensins: Inducible antibacterial peptides. *Immunol Today* 1992; 13:411-415

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)- deficient mice are hyporesponsiveness to lipopolysaccharide: Evidence for TLR 4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-3752.

Ignarro L, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*1987; 84:9265-9269

Ignarro L, Byrns R, Buga R, Wood K. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.*1987, 61:866-879

Ignarro L, Byrns R, Wood K, Chaudhuri G: Pharmacological evidence that endothelium derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J. Pharmacol.Exp. Ther.*1988, 244:181-189

Kirkeboen KA, Strand OA: The role of nitric oxide in sepsis- an overview. *Ac Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 275-288

Kirkland TN, Finley F, Leturq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD 14. *J Biol Chem* 1993; 268, 24818-24823.

Kirshning CJ, wesche H, Ayres TM, Roth M. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1999; 188: 2091-7.

Kooy N, Royall J, Kelly D, et al: Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *AM J Respir Crit Care Med* 1995, 151:1250-1254

Kunz D; Walker G; Eberhardt W; Pfeilschiffer J: Molecular mechanisms of dexamethason inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc Natl-Acad-Sci-USA* 1996 Jan 9; 93(1): 255-9).

Kurrek MM, Castillo L, Bloch KD Tannenbaum SR Zapol WM. Inhaled nitric oxide does not alter endotoxin-induced nitric oxide synthase activity during rat lung perfusion. *J Appl Physiol*, 1995 Oct; 79: 1088-1092.

Kurrek MM, Zapol WM, Holzmann A, Winkler M, Bloch KD. In vivo lipopolysaccharide pretreatment inhibits cGMP release from the isolated –perfused rat lung. *Am J Physiol* 1995 Nov; 269: L618-L624.

Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA: Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF-alpha. *Am J Physiol*. 1991 Oct;261 (4 Pt 1):C634-41.

Laszlo F, Whittle BJ, Evans SM, Moncada S. Association of mikrovaskular leakage with induction of nitric oxide synthase : effects of nitric oxide synthase inhibitors in various organs.. *Eur. J. Pharmacol*, 1995 Sep 5 ;283: 47-53.

Lechin AE, Varon J: Adult respiratory distress syndrome (ARDS): the basics. *J Emerg Med* 1994 Jan-Feb; 12(1):63-8

Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1416-9.

Lewandowski K, Lohbrunner H, Falke J, Das akute Lungenversagen des Erwachsenen: Pathophysiologie, Diagnose und Behandlung. *Pneumologie* 1996; 50:505-517

Lincoln TM, Cornwell TL: Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J*. 1993, 7, 328-338

Lingane, J.J. und Pecsok, R. L. Volumetric determination of nitrate ion. *Anal. Chem.* 1949; 21, 622-625

Liu SF, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Crit Care Med* 1996 Jul; 24(7): 1219-25.

Liu SF, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1208-1213

Lodato RF. Oxygen toxicity. *Crit Care Clinics* 1990, 6, 749-765.

Mackman N, Holland IB. Secretion of a 107 Kdalton polypeptide into the medium from a hemolytic E. coli K12 strain. *Mol Gen Genet* 1984; 193, 312-315

MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Trumbauer M, Stevens K, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. Altered response to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81:641-650

MacNaul KL, Hutchinson NI. Differential expression of iNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Com* 1993; 196,(3), 1330-1334.

Marletta M A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.* 1988;1, 249-257

Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Leturq DJ, Baughman RP, Hudson LD. Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155, 937-944.

Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* 1992; 149; 200-206.

McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1022-1027

McCLEVERTY JA. Reactions of nitric oxide coordinated to transition metals. *Chem. Rev.* 1979; 79, 53-76

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sciences* 2000, 68, 241-258.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7.

Menestrina G, Mackman N, Holland IB, Bhakdi S. E. coli hemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochem Biophys Acta* 1987; 905, 109-116.

Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002 May 21;105(20): 2398-403

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-141

Moncada S, et al: Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 1993, 329, 2002-2012

Myers PR, Wright TF, Tanner MA et al :ERDF and nitric oxide production in cultured endothelial cells: Direct inhibition by *E. coli* endotoxin. *Am J Physiol* 1992;262:H710-H718

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. 1992 FASEB. J. 6:3015-3064

Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100:2417-2423

Nguyen T.; Bronson, D.; Crespi, CL.; Penman, BW.; Wishok, JS. und Tannenbaum, SR. (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3030-3034

O'Donnell C, Liew E. Immunological aspects of nitric oxide. *The Biochemist* 1994; 16(5): 19-22

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 1208-1213

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6

Parker JL, Keller RS, DeFily DV, Laughlin MH, Adams HR. Coronary vascular smooth muscle function in E. coli endotoxemia in dogs. *Am J Physiol* 1991 Mar; 260: H832-41.

Parker JL, Adams HR.. Selective inhibition of endothelium dependent vasodilator capacity by Escherichia coli endotoxemia. *Circ Res*, 1993 Mar; 72: 539-551.

Parsons P, Worthen G, Moore E, et al: The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:294-301

Parsley EL: Acute respiratory distress syndrome. Cellular biology and pathology. *Respir Care Clin N Am* 1998 Dec; 4(4):583-609

Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D. Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* ; 157:387-93.

Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Valance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc. Res.* 1994; 28:34-39.

Pittet J, Mackersie R, Martin T, et al: Biological markers of acute lung injury: Prognostic and pathogenic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1187-1205

Pryor W, Squadrito G: The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995, 268:L699-L722

Pugin J, Schurer MC, Leturq D, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD 14. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90, 2744-2748.

Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite-induced luminol chemluminescence.

*Biochem J* 1993; 290, 51-57

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; ii:1057-1058.

Raetz CRH. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990; 59, 129-170.

Ravichandran LV; Johns RA; Rengasamy A: Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *Am J Physiol* 1995, 268: H2216-H2223.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scientific American* 1992 ; 267, 26-31.

Robertson FM, Offner PJ, Ciceri DP, Pruitt BA Jr.: Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibitors in septic shock. *Arch. Surg* 1994 Feb;129:149-55

Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Zapol WM: Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 329 (1993) 399-405

Ruetten H, Thiemermann C. Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by Aminoguanidine or Aminoethyl-Isothiourea in macrophages and in the rat. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 1996; 225, 5215-530.

Salerno L, Sorrenti V, DiGiacomo C, Romeo G, Siracusa MA. Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2002; 8 (3):177-200

Schumann RR, Zweigner J. A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Clin Chem Lab Med* 1999; 37 (3) :271-274

Schutt C: CD 14. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 May; 31 (5) :545-9

Schütte H, Rosseau S, Czymek R, Ermert L, Walmrath D, Krämer H-J, Seeger W, Grimminger F. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 156, 3, 1997, 819-824.

Schütte H, Mayer K, Gessler T, et al. Nitric oxide biosynthesis in an endotoxin-induced septic lung model: role of cNOS and impact on pulmonary hemodynamics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Feb; 157(2): 498-504

Scott JA, Mehta S, Duggan M, Bihari A, McCormack DG. Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. *Am J Res Crit Care Med* 2002 Vol. 165; 1426-1432

Seeger W, Obernitz R, et al. Lung vascular injury after administration of viable hemolysin-forming *E. coli* in isolated rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1991;143: 797-805

Seeger W, Walter H, et al. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *E. coli* hemolysin in rabbit lungs. *J Clin Invest* 1989; 84: 220-227

Seeger, W., C. Ernst, D. Walmrath, H. Neuhof, and L. Roka: Influence of the thromboxane antagonist BM 13.177 on the arachidonic acid-induced increase in pulmonary vascular resistance and permeability in rabbit lungs. *Thromb. Res.* 1985;40:793-805.

Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Krämer HJ, Schutte H, Ernert L, Kiss L. Adult respiratory distress syndrome: model system using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 1994; 233:549-584.

Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Lau KS, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 1994 Dec;9(6): 2231-2236.

Simon D, Mullins M, Jia L, et al. Polynitrosylated proteins : characterisation, bioactivity, and functional consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4736-4741

Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 1997; 10: 699-707

Skarnes RC. The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum. *Ann NY Acad Sci* 1966; 133, 644-662.

Skarnes RC. In vivo interaction of endotoxin with a plasma lipoprotein having esterase activity. *J Bacteriol* 1968; 95, 2031-2034.

Southan GJ; Szabo C; Thiemermann C : Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br J Pharmacol* Jan 1995;K 114 (2) : 510-516.

Spath JA Jr, Sloane PJ, Gee MH, Albertine KH. Loss of endothelium-dependent vasodilation in the pulmonary vessels of sheep after prolonged endotoxin. *J Appl Physiol* 1994 Jan; 76: 361-369.

Spiestersbach R, Grimminger F, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W. On-line measurement of nitric oxide generation in buffer-perfused lungs: release into both the intravascular and alveolar compartment. *J. Appl. Physiol.* 1995; 78:1502-1508.

Suttorp N, Fuhrmann M, Tannert-Otto S, Grimminger F. pore-forming bacterial toxins potentially induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178:337-341.

Stamler J, Loh E, Roddy M, et al. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89:2035-2040

Stamler, J S; Singel DJ und Lososcalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 1992; 258, 1898-1902

Stewart TE, Slutsky AS. Mechanical ventilation: a shifting philosophy. Current opinion in Critical Care 1 (1995) 49-56

Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Vane JR. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase : interactions between nitric oxide and prostanoids.. *Br-J-Pharmacol* 1995 APR ;114: 1335-42.

Szabo C, Thiemermann C: Invited opinion: Role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic, and anaphylactic shock and thermal injury.*Shock*1994, 2:145-155

Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacology* 2001; 1, 625-635.

Thiemermann C, Wu CC, Szabo C, Perretti M, Vane JR. Role of tumor necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993;110:177-182

Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164, 777-793.

Tracey WR, Nakane M, Basha F, Carter G. In vivo pharmacological evaluation of two novel type II (inducible) nitric oxide synthase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995 May ;73 (5): 665-9.

Tuxen DV. Permissive hypercapnia. In: Tobin MJ Principles and practice of mechanical ventilation. McGraw-Hill New York 1993, 371-392.

Ulevitch RJ: New therapeutic targets revealed through investigations of innate immunity. *Crit Care Med* 2001; 29 (7 Suppl.): 8-12

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM et al. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401: 811-815

Wang D, Wei J, Hsu K, Jau JC et al.. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. *J Biomed Sci* 1999;6:28-35

Walmrath D, Ghofrani HA, Rosseau S, Schütte H, Cramer A, Kaddus W, Grimminger F, Seeger W. Endotoxin „priming“ potentiates lung vascular abnormalities in response to *E. coli* hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1437-1443.

Walmrath, D., J. Pilch, M. Scharmann, F. Grimminger, and W. Seeger: Severe  $V_A/Q$  mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and *E. coli* hemolysin. *J. Appl. Physiol.* 1994; 76(3): 1020-1030.

Watson D, Grover R, Anzueto A, Lorente J, Bellomo R, Grossman S, Donaldson J, LeGall JR. Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: Results of a randomised, double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Crit Care Med* 2004; 32 (1): 13-20

Wei LH, Arabolos N, Ignarro LJ. Certain S-substituted Isothioureas not only inhibit NO synthase catalytic activity but also decrease translation and stability of inducible NO synthase protein.

*Nitric oxide* 1998; Vol.2, No. 3, pp. 155-164

Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxicvasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995 May; 100:159-69

Welch RA, Dellinger EP, Falkow S. Hemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections. *Nature* 1981; 294, 665-667.

Wink, D. A.; Kasprzak, K. S.; Maragos, C. M.; Elespuru, R. K.; Misra, M.; Dunams, T. M.; Cebula, T. A.; Koch, W. H.; Andrews, A. W.; Allen, J. S. und Keefer, L. K. (1991) DNA deaminating ability und genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254, 1001-1003

Winn R, Nickelson S, Rice CL. Fluid filtration coefficient of isolated goat lungs was unchanged by endotoxin. *J Appl Physiol* 1988 Jun;64(6):2463-7.

Wright SD. CD 14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-3

Wu CC, Chen SJ, Szabo C, Thiernemann G, Vane JR. Aminoguanidine attenuates delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of septic shock. *Br J Pharmacol* 1995; 114 (8):1666-72

Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994; 180, 1025-1035.

Wylam ME, Samsel RW, Umans JG, Mitchell Schumacker PT. Endotoxin in vivo impairs endothelium-dependent relaxation of canine arteries in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1990 Dec; 142: 1263-1267.

Wyncoll DLA, Evans TW. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 1999; 354: 497-501.

Xie J, Wang Y, Lipton H, Cai B, Kolls J, Summer WR, Greenberg SS. Tumor necrosis factor inhibits stimulated but not basal release of nitric oxide. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Sep;148: 627-636.

Xue C, Botkin SJ, Johns RA. Localization of endothelial NOS at the basal microtubule membrane in ciliated epithelium of rat lung. *J Histochem Cytochem*, 1996 May;44: 463-471.

Yamasaki K, Edington HD, Tzeng E, Steed DL, Billiar TR. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998 Mar 1; 101:967-71

Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC et al.: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993 73(1), 205-9

Zhang G, Ghosh, S. Molecular mechanisms of NF- $\kappa$ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotox. Research*. 2000 Vol.6, No.6.

Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 1994 149:1375-1380.

## 9. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Seeger für das interessante Promotionsthema und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Forschungsgruppe und seinem Labor unter ausgezeichneten Bedingungen zu arbeiten.

Herrn Dr. Konstantin Mayer danke ich ganz besonders für seine engagierte Betreuung. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein umfangreiches fachliches Wissen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Marc Rühl für die freundliche Einarbeitung in die Versuchsdurchführung sowie Herrn Dr. rer. nat. Tobias Gessler, der mir ebenfalls in der Einarbeitung, in der Durchführung des Analyseverfahrens der Chemilumineszenz und in der Bearbeitung der intravasalen Versuchsdaten eine unschätzbare Hilfe war.

Frau Karin Quanz sei Dank gesagt für Ihre routinierte technische Hilfe und die hervorragende Assistenz bei der Organpräparation.



# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Jan Matthias Schlaudraff  
Wohnort: Am Hohenwedel 41 C  
21682 Stade

geboren am: 5. Februar 1971  
in: Lich, Hessen  
Konfession: evangelisch  
Familienstand: verheiratet mit Andrea Behrens, 2 Söhne; Immo geb.13.9.01  
und Jost geb. 19.12.04

## Schulbildung

1977-1981 Grundschule  
1981-1990 Gymnasium Edertalschule Frankenberg

## Zivildienst

1990-1991 Rettungshelfer beim DRK in Frankenberg

## Hochschulausbildung

10/1991-4/1997 Vorklinisches und klinisches Studium/ Justus-Liebig-  
Universität Gießen  
4/ 1997-3/ 1998 Praktisches Jahr im Hessenklinikum Wetzlar  
Wahlfach Urologie  
28.5.1998 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Gesamtnote: gut

## Nebentätigkeiten

1992 Prüfung zum Rettungssanitäter in Hessen  
1992-1997 Nebentätigkeit im Rettungsdienst beim DRK

## Berufsausbildung/Weiterbildung

8/ 1998-1/ 2000	Arzt im Praktikum , urologische Abteilung des AK St. Georg Hamburg bei PD Dr. Meyer-Moldenhauer.
3/ 2000- 6/ 2000	Assistenzarzt in der Chirurgie, Paracelsusklinik Glückstadt
7/ 2000-10/2001	Assistenzarzt in der Chirurgie bei Dr. Braun/ Prof. Dr. Dahm Krankenhaus Tabea, Hamburg-Blankenese.
Seit 11/2001	Assistenzarzt Urologie bei Dr. Gehring, Elbe Klinikum Stade
5/2005	Facharzt für Urologie

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

